

Université de Montréal

Régulation des cellules NK par les adaptateurs de la famille SAP

par

Romain Roncagalli

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de PhD

En Biologie Moléculaire

Mars 2007

Copyright, Roncagalli, 2007



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Régulation des cellules NK par les adaptateurs de la famille SAP

Romain Roncagalli

Jury composé des membres suivants :

Président rapporteur
Dr. Jean-Philippe Gratton

Directeur de recherche
Dr. André Veillette

Membre du jury
Dr. Jean-François Côté

Examineur externe
Dre Sylvia Vidal

Représentant du doyen de la FES
Dr Jean-Francois Gauchat



SUMMARY

The signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) family of adaptors comprises two characterized members named SAP and EAT-2. These molecules are composed solely of a Src homology (SH2) domain, linked to a short carboxyl-terminal domain of undetermined function. SAP is expressed in T-cells, natural killer (NK) cells and NKT cells, whereas EAT-2 is reportedly present in NK cells, macrophages and dendritic cells. Significant interest in the SAP family was generated by the finding that the *sap* gene is mutated or deleted in X-linked lymphoproliferative (XLP) disease, a fatal human immunodeficiency characterized by a dysregulated response to Epstein-Barr virus infection. Recent studies have shown that SAP associates with tyrosine-based motifs in the cytoplasmic domain of SLAM-related receptors (SRR).

In NK cells, 2B4 (a member of SRR) is abundantly expressed and its engagement by CD48 stimulates the ability of NK cells to kill target cells and to produce inflammatory cytokines (such as IFN- γ). Studies of NK cells from XLP patients demonstrated that SAP is necessary for the ability of 2B4 to trigger NK cell activation. Moreover, cells of SAP deficient mice show impaired killing activities against certain target cells. This function correlates with the ability of SAP to bind the Src kinase FynT through a specific arginine motif localized in the SAP SH2 domain. However, conflicting results are obtained from analysis of the 2B4 deficient mice which indicate that 2B4 can also be an inhibitory receptor.

In this context, we wanted to evaluate the role of EAT-2 in immune cells. As is the case for SAP, we found that EAT-2 interacts with SRR and specially 2B4 in NK cells. However, we established that EAT-2 does not share the binding site for FynT found in SAP. Hence, it may be incapable of coupling SRR to downstream signals and of acting as a natural blocker of SAP. Alternatively, EAT-2 may utilize an as yet undetermined mechanism to enable 2B4 to signal and modulate NK cell functions. To test these possibilities we decided to generate EAT-2 deficient mice. During this process we surprisingly identified a third member of the SAP family that

we called ERT for EAT-2 related transducer. Similar to the expression of SAP and EAT-2, we found appreciable amounts of ERT in NK cells. Therefore, we also generated ERT deficient mice. NK cells from these mice had an increased ability to secrete IFN γ in response to stimulation of activating-coupled ITAM receptors. Moreover, EAT-2 and ERT-deficient NK cells also showed an enhanced capacity to kill target cells. These unexpected results defined EAT-2 and ERT as inhibitory molecules that have a different or opposing role to SAP. Generation of transgenic mice overexpressing EAT-2 or ERT in NK cells confirmed the inhibitory function of these adaptors. The differences in the functions of EAT-2/ERT and of SAP could be due to coupling to distinct downstream signals. In support of that idea, we identified two tyrosine based motifs in the tail of EAT-2 and of ERT. Biochemical analysis of EAT-2 determined the potential of these tyrosines to be phosphorylated. Therefore, we generated new transgenic mice expressing EAT-2^{Y2F}, where the last two tyrosines of EAT-2 were mutated to phenylalanines. Unlike EAT-2 transgenic mice, NK cells from EAT-2^{Y2F} transgenic mice failed to suppress IFN- γ secretion and did not inhibit natural cytotoxicity. These results confirm that EAT-2 is an inhibitor of NK cells and its function is dependant of the last two tyrosines located its carboxyl-terminal tail.

In summary, we have determined that EAT-2 and its close relative ERT are negative regulators of NK cells functions. These data also indicate that EAT-2 operates in 2B4 pathways and probably in SRR pathways, by a novel signaling mechanism, different from that previously described for SAP. This finding could provide an attractive target for therapeutic applications in the field of cancer.

Key words: SAP, EAT-2, 2B4, Natural Killer, XLP.

RESUME

Les adaptateurs de la famille SAP (SLAM associated protein) sont constitués d'un domaine SH2 et d'une courte queue carboxy-terminale. Cette famille comprend deux membres bien caractérisés que l'on nomme SAP et EAT-2. SAP est exprimé dans les cellules T, les NK (natural killer) et les NKT. EAT-2 pour sa part est exprimée dans les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques. Le gène codant pour SAP est muté dans le syndrome de l'XLP (X-linked lymphoproliferative disease), une maladie qui se caractérise par une incapacité à contrôler l'infection au virus de l'Epstein-Bar (EBV). Cette observation définit SAP comme un adaptateur essentiel à la régulation du système immunitaire. Par ailleurs, la fonction de SAP est hautement dépendante de son association aux récepteurs de la famille SLAM (SRR).

2B4, l'un de ces récepteurs, est fortement exprimé sur les cellules NK. Son engagement par son ligand CD48 stimule les cellules NK qui peuvent ainsi produire de l'IFN- γ et lyser des cellules cibles. Cette fonction de 2B4 est défectueuse chez les patients atteints d'XLP, illustrant le caractère essentiel de la protéine SAP. L'activité de SAP est dépendante de sa capacité à recruter la Src kinase FynT grâce à un motif arginine localisé dans son domaine SH2. De manière similaire, les souris déficientes pour SAP démontrent un défaut à tuer certaines cibles. Toutefois, l'analyse de la souris 2B4 déficiente suggère que le récepteur possède aussi une activité inhibitrice. La relation entre cette fonction et les adaptateurs de la famille SAP n'est pas connue.

Le rôle d'EAT-2 n'étant pas connue, nous avons voulu évaluer la fonction et la contribution de cet adaptateur dans les cellules NK. Nos études montrent qu'EAT-2 est aussi capable de s'associer aux SRR et particulièrement à 2B4 dans les cellules NK. Cependant, EAT-2 ne dispose pas du motif arginine propre à SAP, suggérant que cette molécule possède un mécanisme alternatif de signalisation via les SRR. Afin de déterminer la fonction d'EAT-2 nous avons généré une souris déficiente pour cet adaptateur. Lors de ce processus, nous avons découvert un troisième membre à la famille des adaptateurs SAP que nous avons nommé ERT (EAT-2 related transducer).

ERT est aussi exprimé dans les cellules NK, nous avons donc pareillement générer une souris déficiente pour cette molécule. L'analyse des cellules NK de ces souris révèle une augmentation de leur capacité à produire de l'IFN- γ en réponse à des stimulations de récepteurs activateurs couplés à des ITAMs. En outre, ces cellules NK démontrent une meilleure efficacité à lyser certaines cellules cibles. Ces résultats surprenants suggèrent qu'EAT-2 et ERT agissent en qualité d'inhibiteurs dans les cellules NK. Ce rôle inhibiteur a été confirmé par la création de souris transgéniques surexprimant ces deux adaptateurs dans les cellules NK. L'analyse attentive de la séquence d'EAT-2 et ERT révèle l'existence de deux motifs tyrosines capables d'être phosphorylés et donc potentiellement responsables de leur fonction inhibitrice. La génération d'une souris transgénique dont les deux tyrosines ont été mutées en phénylalanines (EAT-2^{Y2F}) confirme le caractère essentiel de ces motifs. A la différence des NK surexprimant la protéine EAT-2 sauvage, la surexpression de la molécule EAT-2^{Y2F} ne modifie ni l'activité lytique des cellules NK, ni leur production d'IFN- γ . Ces résultats démontrent donc qu'EAT-2 est un inhibiteur dont la fonction est dépendante de ces deux tyrosines carboxy-terminales.

En conclusion, nous avons identifié EAT-2 et ERT comme des inhibiteurs des fonctions des cellules NK. La capacité d'EAT-2 à s'associer à 2B4 et à induire un signal intracellulaire par un mécanisme distinct de celui de SAP, pourrait expliquer le double rôle de 2B4 dans les cellules NK. Par ailleurs, ces observations pourraient amener à définir EAT-2 comme une cible potentielle pour des molécules thérapeutiques dans la lutte anticancéreuse.

Mots clefs: SAP, EAT-2, 2B4, Cellules NK, XLP.

TABLE DES MATIERES

Summary and key words	iii
Résumé et mots clefs	v
Table des matières	vii
Liste des Figures et tableaux	xi
Liste des abréviations	xiv
Chapitre I: Introduction	1
1. Remarques générales : les adaptateurs dans les cellules immunitaires	2
2. Notion d'immunologie	2
2.1 Les lymphocytes T	3
2.2 Les cellules NK	6
2.2.1 Notions générales	6
2.2.2 Rôles des récepteurs	8
2.2.3 Souris déficientes affectant les fonctions ou le développement des cellules NK	14
2.2.3.1 Les tyrosines kinases	14
2.2.3.2 Les adaptateurs	15
2.2.3.2 Les phosphatases	16
2.2.3.3 Effecteurs secondaires	17
2.2.3.4 Cytokines et récepteurs associés	18
2.2.3.5 Facteurs de transcription	19
2.3 Les NKT	20
3. Structure générale des adaptateurs	21
4. Les adaptateurs principaux des cellules immunes	22

4.1 Famille LAT	22
4.2 SLP-76	24
4.3 Grb2/GADS	25
4.4 les molécules Cbl	26
 5. Les adaptateurs de la famille SAP	 28
5.1. Nomenclature et structure générale	28
5.2. SAP et XLP	29
5.2.1 SAP dans les cellules T	31
5.2.1.1 Signaux SLAM dépendants	31
5.2.1.2 SAP et les autres membres de la famille SLAM	36
5.2.1.2.1 2B4 (CD244)	36
5.2.1.2.2 Ly108	37
5.2.1.2.3 Ly9 (CD229)	38
5.2.1.2.4 CD84	39
5.2.2 SAP dans les cellules NK	39
5.2.2.1 2B4 et SAP dans les cellules NK	40
5.2.2.2 NTB-A dans les cellules NK	43
5.2.2.3 CRACC	44
5.2.3 SAP dans les cellules NKT	44
5.3 EAT-2 et ERT : des molécules aux fonctions inconnues	45
6. Rôle potentiel des récepteurs de la famille SLAM dans les maladies autoimmunes	46
 7. Problématique et objectifs	 47

Chapitre II: Comparaison dans la structure et la signalisation SAP/EAT-2	49
1. Introduction	50
2. SAP et EAT-2 s'associent aux SRR et induisent un signal intracellulaire spécifique	51
3. Le signal induit par SAP et EAT-2 via SLAM est dépendant des Src kinases	52
4. Spécificité de SAP dans le recrutement de Fyn	53
5. L'arginine R78 dans le domaine SH2 de SAP est requis pour l'interaction avec Fyn	55
6. Discussion	56
7. Légendes des figures	60
 Chapitre III: Negative regulation of NK cells functions By EAT-2, a SAP related adaptor	 69
ABSTRACT	71
RESULTS	74
ERT, a novel SAP-related adaptor	74
Enhanced NK functions without EAT-2 or ERT	75
NK inhibition by EAT-2 or ERT	78
EAT-2 and ERT associate with 2B4	81
EAT-2 and ERT are tyrosine phosphorylated	82
Role of the tyrosines of EAT-2	83
EAT-2 inhibits proximal signaling	84
DISCUSSION	86
METHODS	91
REFERENCES	96

FIGURE LEGENDS	100
Chapitre IV: Discussion	123
1. Les adaptateurs de la famille SAP : des spécificités essentielles	124
2. Le paradigme de 2B4	130
3. EAT-2 et autres récepteurs de la famille SLAM	137
4. Perspective futures	139
5. Conclusions	142
Annexes	143
Références	173

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1: Signalisation générale du TCR	4
Figure 2: Voies de signalisation dans les cellules NK	7
Figure 3: Récepteurs NK de souris	9
Figure 4: Récepteurs NK humains	10
Figure 5: Adaptateurs de la famille SAP	28
Figure 6: Récepteurs de la famille SLAM	29
Figure 7: Signalisation SLAM-SAP dans les cellules T	31
Figure 8: Fonctions des récepteurs de la famille SLAM dans les cellules NK	43

Chapitre II

Figure 1: Régulation de la signalisation de SLAM par SAP et EAT-2	62
Figure 2: Association de SAP ou EAT-2 à SLAM	63
Figure 3: Implication des Src kinases dans la signalisation SLAM-SAP et SLAM-EAT-2	64
Figure 4: Analyse de l'interaction entre FynT et les adaptateurs de la famille SAP	65
Figure 5: L'arginine R78 de SAP est responsable de l'association à FynT	66
Figure 6a: Structure tridimensionnelle et association du complexe SLAM-SAP-FynT SH3	67
Figure 6b:	68

Chapitre III

Figure 1: Expression of SAP family adaptors in normal mouse immune cells	109
Figure 2: Generation of <i>Sh2d1b</i> ^{-/-} and <i>Sh2d1c</i> ^{-/-} mice	110
Figure 3: Functional characterization of IL-2-activated NK cells from EAT-2-deficient and ERT-deficient mice	111
Figure 4: Impact of EAT-2 deficiency on <i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i> NK functions	112
Figure 5: Functional analyses of NK cells from transgenic mice overexpressing EAT-2 or SAP	113
Figure 6: Association of EAT-2 and ERT, and SAP, with 2B4, but not other SLAM-related receptors, in mouse NK cells	114
Figure 7: EAT-2 and ERT, but not SAP, are tyrosine phosphorylated in mouse NK cells	115
Figure 8: The C-terminal tyrosines of EAT-2 are required for inhibition of NK cell functions	116
Figure 9: EAT-2 inhibits proximal events in stimulatory NK receptor signaling	117
SFigure 1	118
SFigure 2a	119
SFigure 2b,c	120
SFigure 3	121
SFigure 4	122

Chapitre IV

Figure 1: Comparaison de la structure entre SAP et EAT-2 (1)	125
Figure 2: Comparaison de la structure entre SAP et EAT-2 (2)	126
Figure 3: Comparaison de séquences entre SAP et EAT-2, accessibilité de potentielle	129
Figure 4: NK humaines, situation normale	130
Figure 5: NK humaines, patient XLP	131
Figure 6: NK de souris, situation normale	132
Figure 7: NK de souris, 2B4 déficiente	134
Figure 8: NK de souris, EAT-2 ou SAP déficiente	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Récepteurs NK. Transducteurs et fonctions	13
--	----

ABREVIATIONS

α -GalCer: α -galactosyl céramide
ADAP: Adhesion and degranulation promoting adaptor protein
ADCC: Antibody dependent cell mediated cytotoxicity
BCL-10: B-cell lymphoma 10
BRC: B cell receptor
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CLNK: Cytokine-dependent hemopoietic cell linker
CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRACC: CD2-like receptor activating cytotoxic cells
Csk: COOH-terminal Src kinase
CTL: lymphocytes T cytotoxiques
DAG: Diacylglycérol
DAP: DNAX-activation protein
Dok1/2: Docking protein 1/2
EAT-2: Ewing's sarcoma-activated transcript 2
EBV: Epstein Bar Virus
EGF: Epidermal growth factor
ERT: EAT-2 related transducer
FIM: Fulminant infections mononucleosis
FT: Facteur de transcription
Fyn: Feline yes related protein
Gads: Grb2 related adaptor protein
GPI: Glycophosphatidyl-inositol
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
HA: hémagglutinine
HLA: Human leukocyte antigen
HPK1: Hematopoietic progenitor kinase 1
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

ICOS: Inducible costimulator
 IFN: Interféron
 Ig: Immunoglobuline
 IκK: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
 IL: Interleukine
 IP3: Inositol triphosphate
 ITAM: Immunoreceptor based Tyrosine Activating Motif
 ITIM: Immunoreceptor based Tyrosine Inhibitory Motif
 Itk: T-cell-specific kinase
 ITSM: Immunoreceptor based Tyrosine Switch Motif
 KI: Knockin
 KIR: Killer inhibitory receptors
 KO: Knockout
 LAK: Lymphocyte activating killer
 LAT: Linker for Activation of T cells
 Lck: Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase
 LCMV: virus de la chorioméningite lymphocytaire
 LFA-1: Leukocyte function-associated molecule 1
 LM: *leishmania major*
 MAPK: Mitogen-activated protein kinase
 MICA/B: MHC class I chain-related A/B
 MIFT: Microphthalmia-associated transcription factor
 MHV-68: virus de l'herpes γ-68 murin
 MO: Moelle osseuse
 MULT-1: Murine UL16-binding protein-like transcript 1
 MCMV: cytomégalovirus murin
 NCR: Natural cytotoxicity receptors
 NFAT: Nuclear factor of activated T-cells
 NF-κB: Nuclear factor NF-kappa-B
 NK: Natural Killer

NKT: Natural killer T
 NTB-A: NK-T-B-antigen
 PiP2: Phosphoinositol biphosphate
 Pi3K: Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase
 PKC: Protein kinase C
 PH: Pleskstrin homology domain
 PLC: Phospholipase C
 PolyI:C : acide polyinosinique, polycytidylique
 PTB : Phosphotyrosine binding
 RADCC : reverse ADCC
 Rael: Retinoic acid early inducible protein 1
 SAP: SLAM Associated Protein
 SH2/3: Src homology domain 2/3
 SHIP: Src homology region 2 [SH2]-domain inositol phosphatase
 SHP: Src homology region 2 [SH2]-domain phosphatase
 SLAM: Signaling Lymphocyte Activating Molecule
 SLP-76: SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
 SRR: Slam-related receptors
 Sos: Son of sevenless
 Src: Rous sarcoma oncogene
 Syk: Spleen tyrosine kinase
 T-bet: T-box transcription factor TBX21
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 TCR: T Cell Receptor
 ULBP: UL16-binding protein
 XLP: X-linked lymphoproliferative
 ZAP70: 70 kDa zeta-associated protein

Dans tout ce qu'on entreprend, il faut donner les deux tiers à la raison et l'autre tiers au hasard. Augmentez la première fraction, et vous serez pusillanime. Augmentez la seconde, vous serez téméraire.

-Le Mémorial de Sainte-Hélène-

Napoléon I^{er}

Plus les hommes seront éclairés, et plus ils seront libres

Voltaire

à Vadim,

que tes passions soient le nerf de ta vie future

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr André Veillette pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fourni un projet de recherche prometteur et excitant. Je le remercie également de m'avoir initié au fameux vin australien, au burger *made in André's home* et de m'avoir appris le goût des manip bien faites. Notre relation a été, je crois forte, dans tous les sens du terme, et j'en suis sorti grandi tant au niveau scientifique que dans ma vie de tous les jours.

Je voudrais aussi remercier la Dre Dominique Davidson pour ses précieux conseils techniques, son extrême gentillesse, son écoute et pour avoir partagé de nombreuses discussions scientifiques en ma compagnie.

Merci aussi au Dr Sylvain Latour, pour ces nombreuses collaborations scientifiques qui ont été riches de succès et d'interactions mutuelles.

J'aimerais aussi remercier tous les membres passés et présents du laboratoire que j'ai côtoyé et grandement apprécié aux cours de ces années :

Tout d'abord James Taylor, un étudiant d'été exceptionnel qui a grandement contribué au travail présenté dans ce mémoire; je lui souhaite de réussir dans la carrière de médecin dans laquelle il est maintenant engagé. Raman Minhas, pour avoir été mon professeur d'anglais (et il y avait du travail à faire...) et mon mentor en port de casquette dans le lab. Jeff Robson pour m'avoir fait découvrir Elvis Gratton lors de ma première soirée à Montréal et Marcin Bakinowski pour son aide technique et sa constante efficacité dans le laboratoire. Laurent Doucet pour avoir été un compagnon de bench aux grandes qualités humaines. Le Dr Ryan Chen pour sa gentillesse et pour les nombreuses expériences corroboratives que nous avons faites ensemble. Xiaochu Shi et Shaohua Zhang pour leur important apport technique tout au long de ces années et en particulier lors de la génération des souris déficientes. Le Dr Mario Ernesto Cruz avec qui nous avons tissé d'importantes relations scientifiques et humaines.

Merci au Dr Claude Lazure, à Danie Gauthier et Daniel Gauthier pour leur grande disponibilité et leur sympathie que j'ai particulièrement appréciée pendant ces années de thèse.

J'aimerais aussi remercier Jeannine Amyot pour sa grande gentillesse et pour son extrême dévouement dont j'ai bénéficié de nombreuses fois.

Un merci aussi à Martine Dupuis et Eric Massicotte pour leur grande aide technique en cytométrie de flux et leur agréable amitié.

Merci aussi à tous ces amis qui ont partagé mon quotidien tout au long de ces années : Benjamin Turgeon pour m'avoir emmené voir des films niaisés au cinéma et pour avoir partagé les crèmes glacées sous le soleil brulant d'août, Mathieu Ferron avec qui j'ai pu partager mon côté rebelle au sein de l'association étudiante. Philippe Coulombe et Genevière Rodier pour leurs discussions scientifiques instructives et passionnantes ainsi que pour leur merveilleuse table d'hôte aux couleurs du sud-ouest. Saloua Saidane pour les agréables soirées passées en sa compagnie, et pour son couscous typique et typé. Damien Garcia et Kadem Lyes pour m'avoir aidé à essayer de refaire le monde autour d'une grenadine, Yohann Rautureau et Sébastien Thibeault pour leur expertise en café et politique française et québécoise (respectivement...).

J'ai la chance d'avoir des parents qui se sont dévoués depuis mon enfance pour que je puisse avoir une bonne éducation et poursuivre des études. Ils ont joué un grand rôle dans la vision du monde que j'ai aujourd'hui et ils m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes ambitions. Pour tout ceci je leur suis et serai toujours reconnaissant.

Ces années n'ont pas seulement été l'occasion de faire de la bonne science, elles ont aussi été riches en bonheur. J'ai eu la chance de rencontrer ma meilleure amie, mon amour et la mère de mon fils qui m'a toujours soutenu par son amour inconditionnel et par son imperturbable joie de vivre du début jusqu'à la fin de cette aventure. Nadia je te remercie d'avoir toujours été là pour moi et maintenant pour nous, tu fais une mère formidable et une partenaire de vie exceptionnelle. J'attends avec impatience les 100 prochaines années de notre vie commune...

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Remarques générales : les adaptateurs dans les cellules immunitaires

Le système immunitaire comprend deux grands groupes cellulaires : la lignée myéloïde et la lignée lymphocytaire. L'engagement des récepteurs antigéniques à leur surface induit un signal intracellulaire qui conduit à une multitude de réponses, telles que la différenciation, l'expansion, l'anergie, la production de cytokines ou encore l'induction de la cytotoxicité. Dans ce contexte, la fonction des adaptateurs intracellulaires est de créer un lien signalitique entre les récepteurs de la surface membranaire et le noyau de la cellule. C'est donc un moyen pour la cellule d'intégrer les signaux provenant du milieu extracellulaire. Les adaptateurs n'ont pas d'activité enzymatique mais ils sont capables d'avoir de nombreuses interactions protéine-protéine ou lipide-protéine. Aux cours des dernières années, l'étude de ces interactions a révélé les fonctions critiques de ces adaptateurs dans la coordination fine des signaux intracellulaires. Ainsi, un dérèglement provoqué par une mutation qui induit la perte de fonction ou la disparition d'un adaptateur conduit fréquemment à des maladies graves. Par exemple, des patients possédant des mutations de l'adaptateur SAP (Slam Associated Protein), développent une maladie lymphoproliférative, l'X-linked Lymphoproliferative Disease (XLP) lorsqu'ils sont infectés par le virus d'Epstein Bar (EBV). Bien que la physiopathologie de cette maladie ait été exhaustivement étudiée (voir plus loin), la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le dérèglement cellulaire reste inconnue. Les données décrites dans cette thèse, portent donc sur l'étude des fonctions moléculaires des adaptateurs de la famille SAP.

2. Notion d'immunologie

Avant de nous intéresser aux adaptateurs de la famille SAP il convient de rappeler quelques données fondamentales d'immunologie. Ces clarifications permettront de mieux comprendre les contextes moléculaires et physiologiques dans

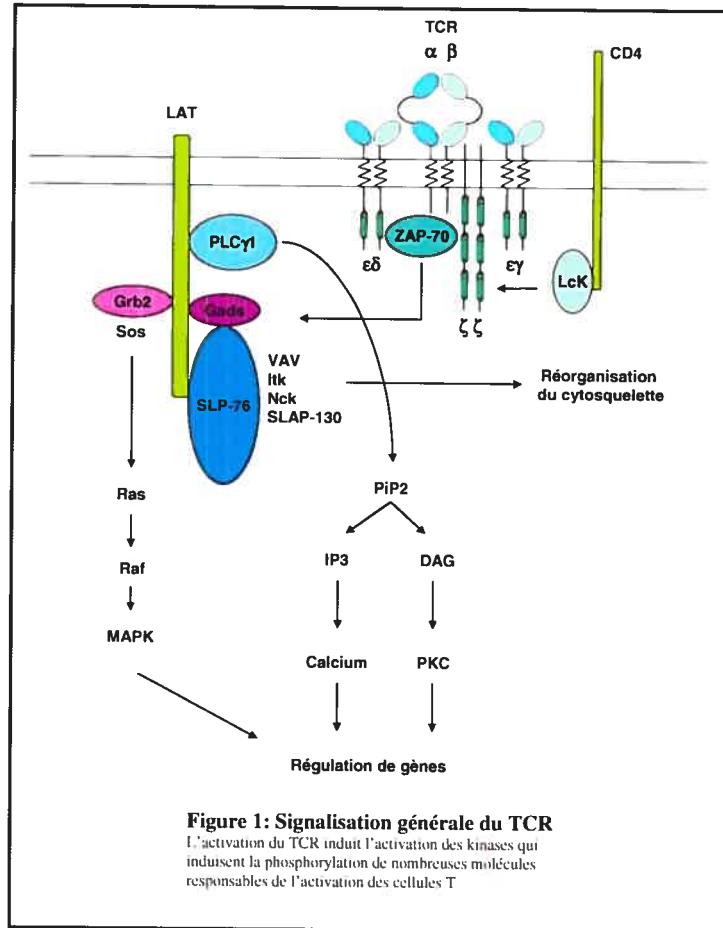
lesquels ces adaptateurs évoluent. On distingue classiquement deux grands types de réponses immunes : la réponse innée et la réponse adaptative. Les macrophages, les mastocytes, les polynucléaires, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer), ainsi que probablement les NKT (Natural Killer T cells) constituent la première barrière défensive contre les pathogènes. Ces cellules sont considérées comme responsables de la réponse innée : après une infection, ces cellules sont activées rapidement et induisent des réponses immunes précoces capables aussi bien d'éliminer les pathogènes que d'initier des réponses adaptatives ultérieures. Au bout de quatre à cinq jours, la réponse adaptative se met en place : les lymphocytes T et B deviennent actifs et défendent l'organisme. Étant donné la quantité exhaustive d'informations qui couvre ce domaine, je me limiterai aux données essentielles et nécessaires à la compréhension des adaptateurs de la famille SAP dans leurs contextes (en l'occurrence les cellules dans lesquelles le rôle de ces adaptateurs a été décrit).

2.1 Les lymphocytes T

On distingue deux classes de lymphocytes T, les cellules $CD4^+$ et les $CD8^+$. Classiquement, les cellules T reconnaissent, grâce à leur récepteur antigénique membranaire (le TCR) des peptides antigéniques associés au CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II ou au CMH de classe I ($CD4^+$ ou $CD8^+$ respectivement) présentés par des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes). Le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β associées aux différentes paires de chaînes CD3 ($\zeta\zeta$, $\epsilon\delta$, $\epsilon\gamma$) (1) (Figure 1). Lorsque le TCR ou les CD3 sont stimulés (de manière physiologique ou par des anticorps), les cellules T sont activées (2). Les chaînes des CD3 sont composées d'un ou plusieurs motifs contenant des tyrosines que l'on nomme les ITAMs (Immunoreceptor based Tyrosine Activating Motif). Au niveau moléculaire, l'activation du TCR induit le recrutement et l'activation de Src kinases (Lck et FynT) qui viennent phosphoryler les motifs ITAMs (3). La phosphorylation des ITAMs permet le recrutement et l'activation d'autres kinases

(Syk et Zap70), qui elles-mêmes phosphorylent de nombreux substrats intracellulaires (4) [dont des adaptateurs (voir plus loin)] responsables de l'activation des cellules T (Figure 1).

Parallèlement à cette signalisation primaire, des stimulations via des co-récepteurs sont nécessaires à la survie et à la réponse des cellules T. La plus étudiée de ces co-stimulations concerne l'interaction entre CD28 sur les cellules T et B7.1/B7.2 (CD80/CD86) sur les CPA (5). En restant succinct, il semble que ce co-stimulus provoque la sécrétion d'IL-2 par les cellules T qui, par autocrinie, promeut leur survie. De plus on a



récemment montré qu'une activation incomplète des cellules T (anti-CD3 seulement par exemple) pouvait conduire à un phénomène particulier que l'on nomme l'anergie. Il s'agit d'un état cellulaire qui se caractérise par l'apparition d'un effet réfractaire à toute stimulation subséquente : les cellules T ne prolifèrent plus et ne sécrètent plus de cytokines (6).

D'autres récepteurs induisent des co-stimulations qui peuvent moduler l'activité des cellules T. On note ainsi l'interaction LFA-1/ICAM-1 importante dans l'adhésion intercellulaire et la réorganisation du cytosquelette durant l'activation des cellules T (7). Dans ce contexte, on a noté, ces dernières années, l'émergence d'une

famille de récepteurs particuliers qui l'on nomme les récepteurs de la famille SLAM (Signaling Lymphocyte Activating Molecule) (8, 9). Ces récepteurs font partie de la superfamille des immunoglobulines. Ils sont exprimés sur la plupart des cellules hématopoïétiques (et tous dans les cellules T). Cette famille comprend SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84, NTBA (Ly108 chez la souris), Ly9 (CD229) et CRACC (CD319). Leur partie extracellulaire est composée d'au moins deux domaines immunoglobulines (Ig), alors que le domaine intracellulaire possède un ou plusieurs motifs ISTM (motif s'apparentant aux ITAMs et ITIMs, voir Figure 6). Les gènes codant pour ces récepteurs sont localisés en tandem sur le chromosome 1 (chez l'humain et la souris). Tous ces récepteurs interagissent de manière homotypique, sauf dans le cas de 2B4 qui a pour ligand CD48, un récepteur `glycophosphatidyl-inositol linked` (GPI-linked) membre de la famille CD2. Du fait du peu de résultats probant concernant ces récepteurs (à l'exception de SLAM et 2B4), je m'attacherai à décrire leurs fonctions dans le contexte des adaptateurs de la famille SAP en me référant aux différents types cellulaires.

Les cellules CD4⁺ activées peuvent se différencier en deux sous types de cellules effectrices que l'on nomme les CD4⁺ Th1 ou CD4⁺ Th2 (Th pour T helper). On associe généralement ces sous types par rapport aux types de cytokines qu'elles sont capables de produire : les Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ (Interféron- γ) alors que les Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-5 (10). Il est aussi généralement admis que le système immunitaire développe une réponse Th1 lors d'une infection par des pathogènes intracellulaires, alors qu'une infection par des pathogènes extracellulaires induit une réponse Th2. La réponse Th2 des cellules T active les cellules B qui se différencient en plasmocytes capables de sécréter des anticorps. Cette action des cellules Th2 nécessite, de plus, une interaction CD40L/CD40 entre les partenaires (cellules T et B respectivement) (11, 12). Des facteurs de transcription jouent aussi un rôle essentiel dans la capacité des cellules T d'induire une réponse Th1 ou Th2. On a ainsi montré que le facteur GATA-3 dans les Th2 et T-bet dans les Th1 étaient des facteurs essentiels à cette différenciation (13-

16). Finalement comme nous le verrons plus loin, il semblerait aussi que SAP et les récepteurs de la famille SLAM aient un rôle important dans ce système.

Bien qu'elles aient la capacité de produire des cytokines (IFN- γ et TNF α), les cellules CD8⁺ activées se distinguent plus par leur rôle cytotoxique envers les pathogènes ou les cellules infectées. Ce rôle cytotoxique dépend de plusieurs molécules : perforine, granzyme B ainsi que du récepteur FasL.

2.2 Les cellules NK

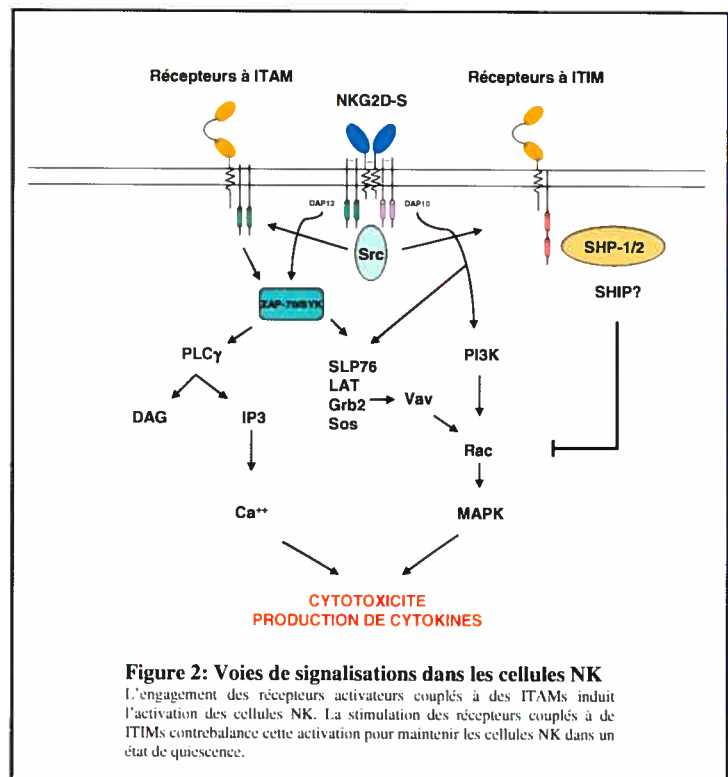
2.2.1 Notions générales

Étant donné qu'une partie importante des résultats de ce mémoire sont relatifs aux cellules NK, cette section sera traitée de façon plus détaillée. Les cellules NK sont des lymphocytes importants de la réponse immunitaire innée identifiables par des marqueurs spécifiques : NK1.1⁺DX5⁺CD3⁻ chez la souris et CD56⁺CD3⁻ chez l'humain (17-19). Ils participent à une réaction immune précoce lors d'infections virales, bactériennes ou parasitaires (20-23). Ce sont aussi des effecteurs importants dans la réponse anticancéreuse (24). A la différence de la réponse adaptative (cellules T et B), les cellules NK peuvent sécréter des cytokines (IFN- γ , TNF- α) et tuer des cellules anormales sans avoir préalablement été activées par un antigène (25). On considère deux types d'état de maturation des cellules NK : un état non activé (resting NK cells) et un état activé dit LAK (Lymphocyte Activating Killer cell). L'état correspondant aux LAK ne s'observe qu'*in vitro* après une culture avec de l'IL-2. Les cellules deviennent alors plus grosses, modifient le niveau d'expression de certains récepteurs (DX5 et CD11b diminuent), et sont capables de produire de grande quantité d'IFN- γ après stimulation d'un récepteur activateur. L'activation des cellules NK peut aussi être induite par d'autres méthodes artificielles. Ainsi on peut provoquer une préactivation en injectant de l'acide polyinosinique et polycytidylique (Poly I : Poly C) directement dans les souris. Il est important de noter que les

connaissances entourant les mécanismes intracellulaires menant à l'activation des cellules NK *in vivo* ne sont pas encore totalement élucidées.

Les cellules NK expriment à leur surface de nombreux récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui reconnaissent des ligands membranaires sur les cellules environnantes (26). Chez la souris, les récepteurs activateurs comprenant CD16 (FcγRIII), Ly49D, Ly49H, NKG2D et NK1.1 sont associés à des motifs de tyrosines activateurs (ITAMs). Chez l'humain il existe d'autres récepteurs activateurs appelés NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) qui possèdent aussi des motifs ITAMs intracellulaires : NKp30, NKp44 et NKp46. Inversement, les récepteurs inhibiteurs (KIR pour Killer Inhibitory Receptors chez l'humain et Ly49 inhibiteurs, Ly49i chez la souris) qui possèdent comme ligand le CMH de classe I (CMH-I) sont associés à des motifs tyrosines inhibiteurs (ITIMs). L'association des Ly49i ou des KIR avec des CMH-I syngéniques maintient les cellules NK dans un état quiescent. Par opposition, la rencontre de cellules NK avec des cellules allogéniques ou CMH-I négatives conduit à une

activation des NK. Ce phénomène est à été décrit dans des expériences de transplantations (graft versus Host : GvH et Host versus Graft : HvG) mais aussi dans le cas d'interactions cellules NK-cellules tumorales (27). Ainsi, il est généralement admis que l'équilibre qui résulte de ces interactions (positives et négatives) détermine l'état d'activation des cellules NK. Il faut

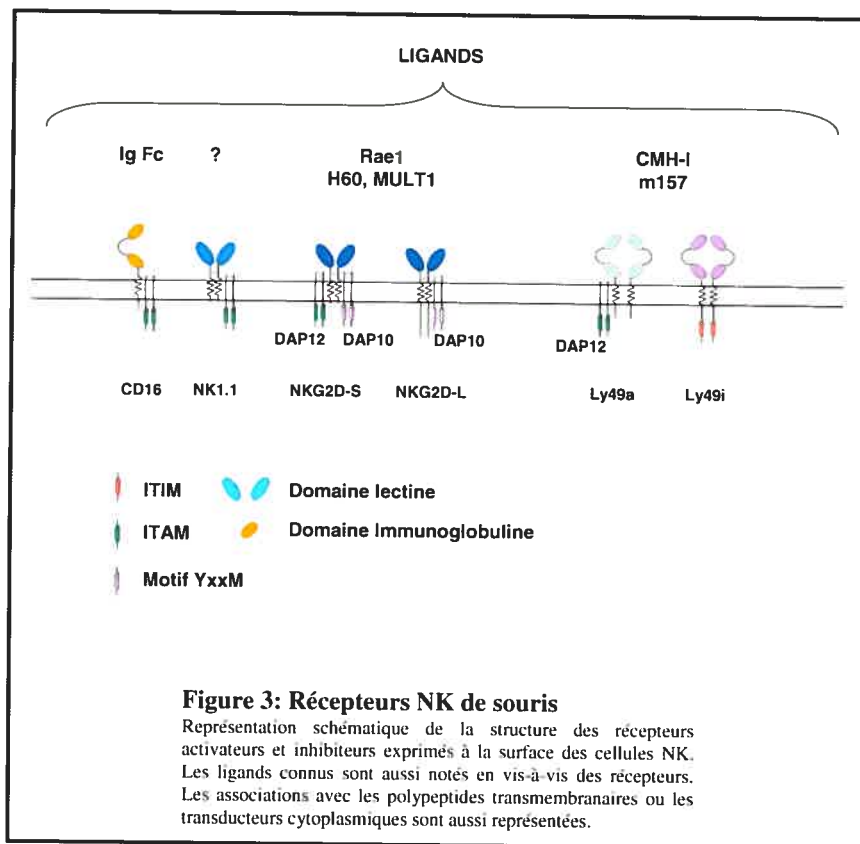


toutefois noter que la plupart des ligands pour ces récepteurs ne sont pas encore bien connus.

Le mécanisme général conduisant à l'activation des cellules NK via ces récepteurs reste très similaire à celui des cellules T (Figure 2) (28-30). La stimulation de ces récepteurs induit le recrutement et l'activation des Src kinases (qui sont par ailleurs toutes exprimées dans les cellules NK) qui phosphorylent les ITAMs et conduisent à l'activation d'effecteurs secondaires. De nombreuses molécules deviennent activées et recrutées, aussi bien des tyrosines kinases (Syk, Zap-70) que des enzymes (PLC γ 1, PLC γ 2, Vav ou Pi3K) ou des adaptateurs (Grb2, Lat) (Figure 2). Les récepteurs inhibiteurs (couplés à des ITIMs) sont aussi phosphorylés par des Src kinases, mais à la différence des ITAMs, les motifs inhibiteurs activent des phosphatases (principalement SHP-1 et SHP-2 dans les cellules NK).

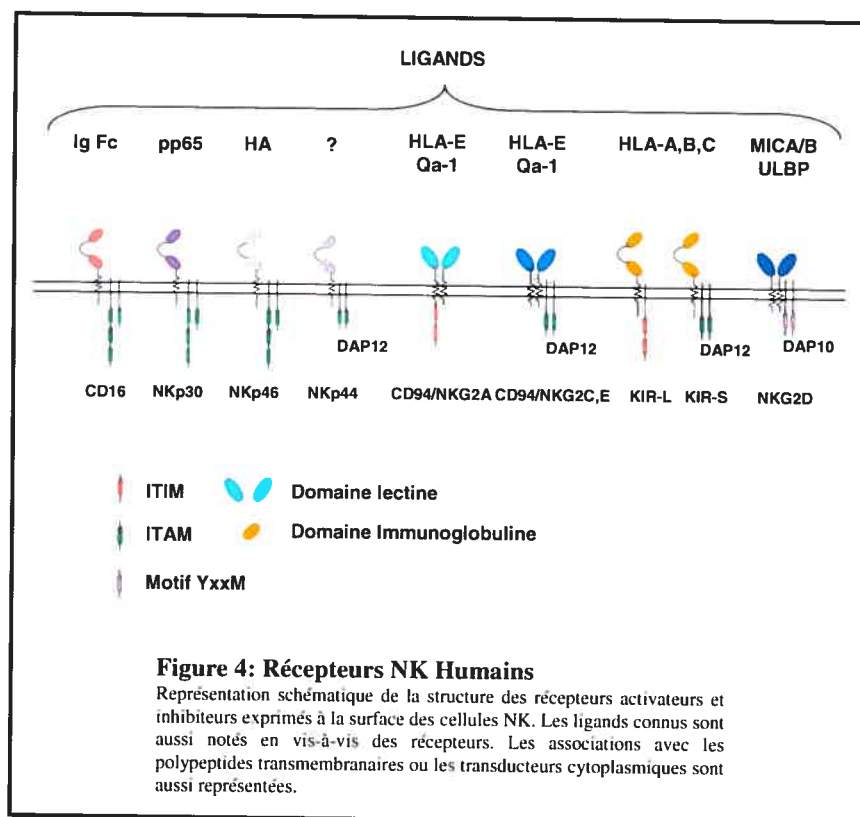
2.2.2 Rôles des récepteurs

Chez l'humain CD16 (Fc γ RIIIa) est associé indifféremment à un hétérodimère CD3 ζ -Fc ϵ RI γ ou à des homodimères CD3 ζ et Fc ϵ RI γ (31, 32). Chez la souris seule l'association en hétérodimères Fc ϵ RI γ à été observée. Ce récepteur est capable de reconnaître la partie Fc des immunoglobulines (des IgG), ce qui l'implique dans un mécanisme dit d'ADCC (Antibody dependent Cell-mediated Cytotoxicity) : les cellules cibles opsonisées sont tuées par les cellules NK. Il existe un autre mécanisme de lyse anticorps dépendant : dans ce cas, un anticorps spécifique reconnaît par sa partie Fab un récepteur activateur sur les cellules NK et par sa partie Fc un récepteur Fc sur les cellules cibles. Ce mécanisme dit de RADCC (Reverse ADCC) aboutit aussi à la lyse des cellules cibles.



L'un des récepteurs les plus étudiés est NKG2D. Les ligands de ce récepteur sont des protéines de stress cellulaires (MICA/B, ULBP chez l'humain, protéine de la famille Rae1, H60 et Mult1, chez la souris) exprimés par des cellules anormales (cellules tumorales, cellules infectées) (Figure 3 et 4) (33-36). Contrairement à l'humain, chez la souris on distingue deux isoformes de ce récepteur : une forme longue NKG2D-L et une forme courte NKG2D-S (Figure 3). NKG2D-S s'associe avec deux types d'adaptateurs : DAP12 qui possède un motif ITAM et DAP10 dont la partie intra-cytoplasmique est composée par un motif YxxM (Y pour tyrosine, M pour méthionine, x pour un acide aminé quelconque) très similaire au motif du récepteur CD28. Par sa part, NKG2D-L est seulement capable d'interagir avec DAP10 (37-39). L'engagement de NKG2D induit la phosphorylation de DAP12 et DAP10 (présumément par les Src kinases). Dans le cas de DAP12, le motif ITAM recrute SYK ou ZAP-70 qui eux-mêmes activent des effecteurs secondaires provoquant la sécrétion d'IFN- γ et l'augmentation de la cytotoxicité. La signalisation

de DAP10 est différente, en effet son motif est capable de s'associer à la Pi3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase) ce qui conduit seulement à une élévation de l'effet cytotoxique (Figure 2). La modulation de l'expression de la forme courte ou la forme longue de NKG2D est sujette à l'état d'activation des cellules NK. Ainsi les cellules NK non activées et les LAK tardifs (7-10 jours) n'expriment que la forme longue. Par opposition, les LAK précoces ou les NK préactivés par du PolyI:C possèdent les deux formes à leur surface (40). Chez la souris, cette modulation fine d'expression est donc un moyen de contrôler des réponses intracellulaires distinctes. Chez l'humain, le signal de NKG2D-L unique est seulement dépendant de l'adaptateur DAP10. Il en résulte une activation de la Pi3K et d'un recrutement d'effecteurs tels que SLP-76, Vav1 et la PLC γ 2. Dans ce cas ci, seul le niveau de cytotoxicité est modifié (41, 42).



Chez l'humain on retrouve une classe particulière de récepteurs activateurs : les NCRs, qui comprennent NKp30, NKp44 et NKp46 (Figure 4). Les ligands de ces

récepteurs sont mal connus: NKp46 semble être capable de reconnaître des hémagglutinines virales (HA) (43) alors que NKp30 reconnaît la glycoprotéine pp65 du cytomégalo virus humain (44). Contrairement à NKp30 et NKp46, NKp44 est exprimé seulement à la surface des LAK. Ces récepteurs sont composés d'une chaîne de domaines immunoglobulines (IgV ou IgC) associées à des polypeptides contenant des motifs ITAMs. NKp30 et NKp46 s'associent à des dimères (toutes les combinaisons étant possibles) de chaînes CD3 ζ -Fc ϵ RI γ alors que NKp44 est seulement couplé à DAP12 [Moretta, 2004].

D'autres récepteurs activateurs sont exprimés sur les cellules humaines. NKG2C et NKG2E qui dimérisent avec la molécule invariante CD94. Ces hétérodimères peuvent s'associer à DAP12 pour générer un signal de stimulation. Étrangement ces récepteurs reconnaissent le HLA-E ou Qa-1 des CMH-I qui sont peu variables.

La famille des récepteurs Ly49 comprend de nombreux membres qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs (45, 46). Ils sont constitués du domaine lectine de type II-C et s'expriment à la surface des cellules NK exclusivement sous la forme d'homodimères (Figure 3). Il existe une grande hétérogénéité dans le polymorphisme allélique entre les différentes lignées de souris. Les Ly49i reconnaissent classiquement les CMH-I présentés par les cellules environnantes. Cette interaction, via un ITIM, induit un signal inhibiteur dans la cellule NK grâce au recrutement de SHP-1 et SHP-2. Chaque Ly49i s'associe spécifiquement à des allèles du CMH-I (Tableau 1). Bien que les Ly49i n'aient pas une spécificité particulière pour un peptide, le CMH-I doit tout de même être associé à un peptide pour que l'interaction survienne (47). Par ailleurs, la famille des Ly49 comprend des récepteurs activateurs (Ly49a). Chez les souris C57Bl/6 on en dénombre deux : Ly49D et Ly49H. Contrairement aux Ly49i, ces récepteurs s'associent et transmettent leur signal intracellulaire par l'intermédiaire de DAP12 (Figure 3). Ces signaux activateurs sont dépendants des Src kinases et se caractérisent par une augmentation de la cytotoxicité et de la production de cytokines. Récemment, une étude a montré que ces récepteurs pouvaient être des partenaires critiques dans la réponse antivirale (48, 49). Ainsi

Ly49H est capable de reconnaître le peptide m157 du cytomégalo virus murin (MCMV). Cette interaction induit un signal stimulateur dans les cellules NK qui activent alors leur capacité de lyse contre les cellules infectées. Cette constatation explique dans une certaine mesure la capacité des souris C57Bl/6 à être résistante à ce virus. Par opposition, les auteurs ont aussi remarqué que ce même peptide est capable de lier Ly49I (un Ly49i) exprimé dans les souris 129 sv/J. Dans ce cas, le signal généré est un signal inhibiteur qui confère un effet protecteur au virus. Cette observation démontre l'importance primordiale de ces récepteurs et de leurs différents rôles à l'égard des pathogènes.

Chez l'humain, les Ly49i sont remplacés par les KIR (50-52). Contrairement aux Ly49, les KIR possèdent trois domaines Immunoglobulines et se présentent en monomères à la surface cellulaire. Leur partie intracellulaire est constituée de deux ITIMs capables de recruter les phosphatases SHP-1 et SHP-2. Les KIR jouent le même rôle que les Ly49i: ils maintiennent les cellules NK dans un état de quiescence en interagissant avec des HLA-I spécifiques. CD94/NKGA, un autre récepteur inhibiteur, est aussi capable de reconnaître les HLA non classiques (HLA-E et Qa-1) (53, 54). La variabilité d'expression des KIR et de CD94/NKG2A est à l'origine du répertoire diversifié des cellules NK humaines.

Des récepteurs de la famille SLAM sont également exprimés sur les cellules NK, ce point sera introduit ultérieurement.

Il est difficile de comprendre à la fois, la redondance dans la signalisation intracellulaire et la diversité dans l'expression de récepteurs antigéniques. Il est probable qu'une modulation fine des signaux détermine un état d'activation adapté à la cible rencontrée. Nous verrons plus loin, dans quelle mesure les adaptateurs de la famille SAP pourraient y jouer un rôle.

Espèce ou lignée	Récepteur	Fonction	Transducteur	Ligands
Souris	CD16	Activateur	Chaîne γ	IgG
	NKG2D	Activateur	DAP10/DAP12	Rae1, H60 et Mult1
	2B4	Activateur/Inhibiteur	SAP/EAT-2	CD48
C57Bl/6	Ly49A	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^{b,d,k}
	Ly49C	Inhibiteur	ITIM	H2-K ^{b,d} H2-D ^{b,d,k}
	Ly49G	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^d
	Ly49I	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^{b,d} H2-K ^d
	Ly49D	Activateur	DAP12	H2-D ^d
	Ly49H	Activateur	DAP12	m157
	NKrp1c NK1.1	Activateur	Chaîne γ	Inconnu
129 svj	Ly49G	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^d H2-K ^d
	Ly49I	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^k H2-K ^{b,d,k} m157
	Ly49O	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^d H2-L ^d
	Ly49V	Inhibiteur	ITIM	H2-D ^{b,d,k} H2-K ^b H2-L ^d
	Ly49P	Activateur	DAP12	H2-D ^d
	Ly49U	Activateur	DAP12 ?	Inconnu
	Ly49R	Activateur	DAP12 ?	Inconnu
Humain	NKp30	Activateur	Chaîne γ ou ζ	pp65 CMV
	NKp44	Activateur	DAP12	Inconnu
	NKp46	Activateur	Chaîne γ ou ζ	HA
	NKG2D	Activateur	DAP10	MICA/B, ULBP
	2B4	Activateur/Inhibiteur ?	SAP/EAT-2?	CD48
	CD94/NKG2A	Inhibiteur	ITIM	Qa-1, HLA-E
	CD94/NKG2C,E	Activateur	DAP12	Qa-1, HLA-E

Tableau 1: Récepteurs des cellules NK. Transducteurs et fonctions

2.2.3 Souris déficientes affectant les fonctions ou le développement des cellules NK

2.2.3.1 Les tyrosines kinases

Les Src kinases sont les tyrosines kinases les plus proximales impliquées dans la signalisation de nombreux récepteurs exprimés à la surface des cellules NK. La famille des Src kinases comprend Lck, FynT, Hck, Fgr, Yes et c-Src. Tous les membres sont exprimés dans les cellules NK à des niveaux plus ou moins variables (résultats personnels). Bien que la plupart des souris déficientes pour chacune de ces protéines soient facilement disponibles, peu d'études rigoureuses (fond génétique pur) ont été entreprises pour déterminer les effets de ces déficiences dans les cellules NK. Seuls des phénotypes concernant les déficiences de Lck et de Fyn ont été rapportées. Les souris Fyn^{-/-} montrent une diminution de la cytotoxicité vis-à-vis de certaines cibles telles que les RMA-S, les C4.4-25, les YAC-1 et les YB (55) (résultats personnels). Par ailleurs les NK de ces souris expriment significativement moins de récepteurs Ly49A, laissant supposer que Fyn pourrait être impliquée dans la mise en place du répertoire des cellules NK pendant leur différenciation [Lowin-Kropf, 2002]. Enfin Fyn semble être important, comme nous le verrons plus en détails (section 5.2.2) dans la signalisation du récepteur 2B4 via l'adaptateur SAP (56). Par opposition et de manière surprenante, les souris Lck^{-/-} ne montrent pas de modification dans la cytotoxicité des cellules NK (55) (résultats personnels). Il est probable que la redondance des Src kinases explique, en partie du moins, les phénotypes peu prononcés observés dans les cellules NK.

En aval dans la voie de signalisation, les kinases de la famille de Syk (Syk et ZAP-70) sont essentielles au bon fonctionnement de nombreux récepteurs activateurs. L'invalidation de l'une ou l'autre de ces protéines ne suffit pas à générer un phénotype dans les cellules NK (57, 58) (à la différence des effets marqués observés dans les cellules B ou T). En fait il a fallu attendre une étude récente des souris doublement déficientes pour Syk et ZAP-70 pour montrer de profonds

disfonctionnements dans les cellules NK. Bien que leur capacité à lyser certaines cibles (cibles dont les ligands ne stimulent pas des récepteurs couplés à des ITAMs) soit maintenue, les auteurs montrent une diminution de la cytotoxicité dans le mécanisme de RADCC (dépendant de CD16) et dans la production d'IFN- γ dépendante de récepteurs couplés à des ITAMs (59).

Plus récemment, une étude s'est intéressée à une famille de récepteurs qui sont exprimés sur les cellules NK et qui possèdent une activité tyrosine kinase. Cette famille (famille TAM) comprenant trois membres (Tyro3, Axl et Mer) semble jouer un rôle dans le développement des cellules NK (60). En effet, le triple mutant TAM^{-/-} affecte dramatiquement le niveau d'expression de nombreux récepteurs de surface (DX5, Ly49, NKG2D) ainsi que la capacité de lyse et de sécrétion de cytokines des cellules NK. Les auteurs montrent en fait que ces anomalies de développement sont dues à l'absence de signalisation de ces récepteurs qui sont normalement activés par des facteurs solubles tels que Gas6 ou la protéine S.

2.2.3.2 Les adaptateurs

Comme mentionné précédemment, DAP10 et DAP12 jouent un rôle crucial dans la signalisation de différents récepteurs exprimés sur les NK (NKG2D, NKp44, Ly49D/H, CD94-NKG2C). Chacun de ces adaptateurs a été successivement supprimé afin d'étudier leurs fonctions dans les cellules NK. Les souris DAP12^{-/-} déficientes démontrent une diminution de la production d'IFN- γ en réponse à l'engagement des récepteurs NKG2D et Ly49D, ainsi qu'une incapacité à tuer des cibles exprimant les ligands pour NKG2D (37). Par ailleurs, des études *in vivo* dans lesquelles des souris sont infectées par le MCMV démontrent une susceptibilité des souris DAP12^{-/-} au virus, caractérisée par une augmentation du titre viral dans la rate et le foie présumément due à l'incapacité de Ly49H de signaler en l'absence de DAP12 (61-63). Similairement, mais dans une moindre mesure, les souris DAP10^{-/-} montre une réduction partielle des cellules NK à tuer des cibles exprimant des ligands pour NKG2D. Cette observation est certainement la conséquence d'une association plus

sélective de DAP10 (association seulement documentée avec NKG2D) par rapport à DAP12 (38).

2.2.3.2 Les phosphatases

Comme évoqué précédemment, le rôle des Src kinases est essentiel pour la fonction des cellules NK. Il est bien connu que l'activation des Src kinases est dépendante de la protéine tyrosine phosphatase CD45 qui déphosphoryle la tyrosine carboxy-terminale inhibitrice des Src kinases (Y527 de Src) (64, 65). Plusieurs études utilisant des souris CD45^{-/-} démontrent une altération dans le développement des cellules NK. On dénote, non seulement une augmentation du nombre cellules NK dans la rate, mais aussi une réduction de l'expression de certains récepteurs tels que Ly49D et CD244 (2B4) (66). Par ailleurs, ces cellules manifestent un défaut prononcé dans la sécrétion d'IFN- γ en réponse aux stimulations des récepteurs CD16, NK1.1, Ly49D et NKG2D (66, 67). Il est intéressant de remarquer que tous ces récepteurs sont dépendants de l'activation des Src kinases. En accord avec ces résultats, les récepteurs ITAMs indépendants (récepteurs pour l'IL-18, l'IL-12) ne semblent pas être affectés par la délétion. Paradoxalement, l'étude de la cytotoxicité de ces cellules ne montre aucun défaut associé à la perte de CD45, et ceci même en ce qui concerne des cibles dont les ligands sont dépendants de récepteurs à ITAMs (Ly49D/H pour CHO, YAC et RMA-Rae pour NKG2D). Cette dichotomie dans le rôle de CD45 entre la production de cytokines et la cytotoxicité demeure inexplicable pour le moment.

Deux autres protéines tyrosines phosphatases sont essentielles dans la fonction des cellules NK, il s'agit de SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases s'associent par leurs domaines SH2 aux motifs ITIMs de récepteurs inhibiteurs tels que les KIR et les Ly49i. Le potentiel inhibiteur de ces phosphatases se caractérisent par leur capacité à déphosphoryler et donc à désactiver de nombreuses protéines activatrices incluant des kinases proximales (Syk kinases) ou des effecteurs essentiels tel que l'adaptateur LAT ou les PLC- γ (68). Il est aussi possible que ces phosphatases aient

une action plus restreinte à certaines protéines. Une étude a ainsi montré que la diminution de l'activité cytolytique des NK suite à l'engagement de KIRs est la conséquence d'une inhibition de l'activité enzymatique de Vav induit par SHP-1 (69). La souris SHP-2 déficiente étant létale à l'état embryonnaire, seule la souris *me^v/me^v* (dont le domaine catalytique de SHP-1 est muté) a été étudiée. Dans cette souris, la fonction inhibitrice du récepteur Ly49A (un Ly49i) est abolie, rendant les cellules NK plus autoréactives (70). Par ailleurs, cette mutation affecte de manière importante le répertoire et l'expression des récepteurs Ly49 (71), suggérant que SHP-1 est requis pour le développement et l'éducation normale des cellules NK. Il convient donc d'interpréter avec prudence les résultats obtenus dans les cellules NK matures provenant de ces souris.

Cette modification du répertoire des cellules NK se retrouve aussi chez la souris déficiente pour la 5'-inositol phosphatase SHIP (72). Selon cette étude, SHIP serait, à la manière de SHP-1/2, recruter, elle aussi aux récepteurs inhibiteurs Ly49. Il reste néanmoins de nombreux points à élucider sur le rôle exact de cette phosphatase dans les cellules NK.

2.2.3.3 Effecteurs secondaires

Les événements de signalisation proximaux permettent le recrutement et l'activation d'effecteurs secondaires responsables de la libération du calcium intracellulaire, de la réorganisation du cytosquelette, ainsi que de la polarisation et de la fusion des granules cytotoxiques. Parmi ces acteurs de la signalisation, les protéines de la famille Vav (Vav-1, Vav-2 et Vav-3) semblent jouer un rôle important dans la fonction des cellules NK. Les protéines Vav font partie de la famille des GEF (guanine exchange factor) qui sont capables d'activer les petites protéines G (famille Rac-Rho). Chacune des protéines Vav a été sélectivement altérée dans la souris et conduit à un phénotype dans les cellules NK. Les premières études des NK dérivées des souris *Vav-1^{-/-}* révèle un défaut dans le processus de la cytotoxicité naturelle, de l'ADCC et le RADCC (73, 74). On note cependant une contradiction avec une étude

plus récente comparant des NK issues de souris Vav-1^{-/-}, Vav-2^{-/-} et Vav-3^{-/-}. En effet, les souris Vav-1^{-/-} montrent une diminution sélective de la cytotoxicité associée à DAP10 alors que les souris Vav-2 et Vav-3 déficientes présentent une réduction de la cytotoxicité ITAM dépendante (75). Ces différences peuvent être attribuables soit au fond génétique variable utilisé pour ces études (B10.Br vs C57Bl/6), ou à l'expression de ligands par les cellules cibles pour des récepteurs inconnus des cellules NK. Il est tout même intéressant de constater que la sécrétion de cytokine (IFN- γ) n'est pas affectée par les délétions des protéines Vav.

Parmi les effecteurs secondaires les plus importants, les phospholipases C gamma (PLC γ) jouent un rôle clef en clivant le PIP₂ (Phosphoinositol biphosphate) en DAG (Diacylglycérol) et IP3 (Inositol triphosphate), responsables de l'activation de la PKC et de la libération du calcium intracellulaire respectivement. Les deux isoformes PLC γ 1 et PLC γ 2 sont exprimées dans les cellules NK. Les souris PLC γ 1 déficientes étant létales à l'état embryonnaire (76), seule les NK issues des souris PLC γ 2^{-/-} ont été étudiées (77). Ces cellules manifestent de nombreux défauts dans la fonction des cellules NK, incluant la réponse cytotoxique, la sécrétion de cytokines, la dégranulation et naturellement, la libération de calcium intracellulaire. Comme certains des KOs cités précédemment, les NK PLC γ 2^{-/-} ne possèdent pas un répertoire normal concernant l'expression des récepteurs de surface. La plupart des Ly49 sont nettement moins exprimés, suggérant que PLC γ 2 joue aussi un certain rôle dans l'éducation et la maturation des cellules NK immatures.

2.2.3.4 Cytokines et récepteurs associés

Les cytokines ont un rôle très important au cours du développement des NK dans la moelle osseuse (MO). Les délétions des cytokines et des récepteurs conduisent principalement à des anomalies de maturation. La mutation de la chaîne commune γ des récepteurs des cytokines (γ_c) provoque une disparition complète des cellules NK en périphérie et une diminution importante du nombre de cellules NK

immatures dans la MO (78, 79). On comprend aisément la fonction cruciale de cette chaîne qui est impliquée dans la structure des récepteurs pour l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. Ces résultats montrent clairement le rôle primordial des cytokines, mais donnent peu d'informations sur leur hiérarchie dans le contexte des cellules NK. La génération des souris IL-15, IL-15R α et IL-2R β déficientes indique clairement les cytokines nécessaires à la génération des cellules NK. En effet, ces souris se caractérisent par une réduction importante du nombre de cellules NK en périphérie et une perte totale de leur capacité de lyse *in vitro* (80-83). L'étude d'autres souris déficientes pour des couples récepteurs-ligands montrent aussi des effets sur l'homéostasie des cellules NK. On note ainsi une réduction des capacités cytotoxiques, et des anomalies dans le développement des cellules NK dans les souris c-Kit^{-/-}, FLT3-L^{-/-} (84, 85).

2.2.3.5 Facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription (FT) sont impliqués dans le développement des cellules NK. Parmi ceux-ci, la famille des FT ETS, qui reconnaissent généralement des séquences de type GGAA, semblent jouer un rôle primordial dans la génération des cellules NK. Les souris MEF^{-/-} (myeloid elf-like factor), EST-1^{-/-}, PU.1^{-/-} révèlent toutes des altérations dans la genèse des cellules NK, qui conduisent à une réduction importante des cellules NK matures en périphérie (86-88). On remarque également une diminution de la fonction cytotoxique dans le cas des souris déficientes pour MEF et EST-1. Ce dernier phénotype peut probablement s'expliquer par le fait que MEF contrôle le promoteur du gène de la perforine. De la même façon les NK de souris avec l'allèle mutant *mi* de MITF (microphthalmia-associated transcription factor), un FT de type Leucine Zipper, n'expriment pas de perforine et sont donc incapables de lyser des cellules tumorales (89). On peut finalement mentionner que certains FT sont importants pour la production de cytokines dans les cellules NK. Ainsi les NK des souris déficientes pour CEBP γ (CCAAT-enhancer binding protein- γ) ou pour GATA-3 produisent

moins d'IFN- γ (90, 91) par rapport à leurs consœurs sauvages. Les mécanismes relatifs à ces déficiences ne sont pas connus, et différentes hypothèses peuvent être retenues. Il est en effet possible que ces FT régulent directement le promoteur du gène de l'IFN- γ ou co-interagissent avec d'autres FT importants pour la production de cytokines tel que AP-1 ou NF-IL6. Il est aussi possible que le phénotype de ces souris ne résulte pas directement d'un défaut intrinsèque à la cellule, mais qu'il soit la conséquence d'un biais dans la différenciation qui conduit à la sélection et à l'expansion d'une population de cellules NK particulières.

2.3 Les NKT

Les cellules NKT constituent une population de lymphocytes minoritaires à la frontière entre les cellules T et les cellules NK. Au même titre que les cellules NK, les NKT sont impliquées dans la surveillance anti-tumorale, anti-pathogène et dans les phénomènes d'auto-immunité. Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques. Elles sont (chez la souris) NK1.1⁺CD3⁺ et possèdent un répertoire restreint du TCR. En effet la majorité de ces cellules expriment la région variable V α 14 et la région de `join` J α 18 (V α 24J α 18 chez l'humain). Ce TCR particulier interagit avec une molécule de classe I dite non classique : le CD1d. Contrairement aux cellules T, les NKT ne reconnaissent pas des peptides classiques, mais plutôt des glycolipides. L'un des mieux caractérisé, dérivé d'une éponge marine, est le glycosphingolipide α -galactosyl céramide (α -GalCer) présenté dans le contexte du CD1d. Les NKT peuvent aussi reconnaître des ligands plus physiologiques tels que des lipides endogènes (l'antigène isoglobotriaosylcéramide, iGb3) (92) ou exogènes comme le phosphatidylinositol-mannoside mycobactérien (93). Les NKT possèdent une capacité cytolytique et une faculté à produire de grandes quantités de cytokines peu de temps après une infection. Elles peuvent sécréter de l'IL-4, de l'IL-13 ainsi que de l'IFN- γ qui ont pour rôle d'activer de nombreux autres types cellulaires incluant les cellules T, les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques.

3. Structure générale des adaptateurs

La structure des adaptateurs est caractérisée par la présence de domaines d'interactions spécifiques. Ils sont habituellement constitués de 40 à 150 amino-acides qui forment une structure tridimensionnelle capable de reconnaître des séquences de quelques acides aminés (de 3-10) {Pawson, 1995}. Ces interactions (entre domaines et séquences) peuvent être intermoléculaires ou intramoléculaires. On peut classer les principaux domaines qui sont communément présent dans les adaptateurs des cellules immunitaires en fonction de règles sur leurs motifs d'interactions.

Le domaine SH2 a été découvert en 1986 comme étant un des premiers domaines non catalytique conservé entre des protéines tyrosine kinases (94). Le domaine SH2 (Src homology 2) et le domaine PTB (phosphotyrosine binding) reconnaissent des motifs possédant des tyrosines. Les SH2 sont des modules d'environ 100 acides aminés formant des feuillets β antiparallèles centraux entourés de deux hélices α (94). Le domaine SH2 interagit avec les séquences de type pYxxv (pY pour phosphotyrosine, x pour un acide aminé quelconque et v pour un acide aminé hydrophobe). La tyrosine phosphorylée interagit avec l'arginine située dans la poche de fixation conservée des domaines SH2. Les acides aminés situés en aval de la tyrosine phosphorylé (position +2 et +3) détermine la capacité du peptide à s'associer avec plus ou moins de stringence au domaine SH2 (95). L'affinité entre le domaine SH2 et le peptide phosphorylé est de l'ordre de 10 à 100 nM. Bien que la plupart des interactions entre domaines SH2 et peptides phosphorylés se réalisent entre deux molécules différentes, il arrive que les domaines SH2 joue un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique de certaines protéines. Dans le cas de Src kinases, lorsque celles-ci sont dans un état inactif, le domaine SH2 est associé à la tyrosine Y527 située dans la partie carboxy-terminale. Cette association empêche la phosphorylation de la tyrosine Y416, une tyrosine essentielle pour l'activation de ces

kinases (96). Le domaine PTB constitué de 100 à 150 acides aminés possède une même structure tertiaire de 2 feuillets β orthogonaux stabilisés par des hélices α (97). Il reconnaît les séquences NPxY (N pour asparagine, P pour proline et Y pour tyrosine) où la tyrosine n'est pas nécessairement phosphorylée.

Le domaine SH3 (Src homology 3) constitué d'une soixantaine d'acides aminés interagit classiquement avec des séquences riches en prolines. On distingue deux types de séquence; type I : R/KxxPxxP (R pour arginine, K pour lysine) et la type II : PxxPxR/K. Ces enchainements de prolines confèrent à la protéine une structure spécifique, rigide et en hélice {Cicchetti, 1992; Yu, 1994; Ren, 1993}.

Le domaine PH (Pleskstrin Homology domain), qui permet aux protéines d'être adressées à la membrane, est capable de s'associer aux phosphatidylinositols (PIPs) présent dans ces mêmes membranes. Ce domaine contient une région positivement chargée au niveau des boucles variables et un résidu tryptophane conservé situé au milieu de l'hélice alpha carboxy-terminale {Lemmon, 1996; Harlan, 1994}.

4. Les adaptateurs principaux des cellules immunes

Afin d'introduire les adaptateurs de la famille SAP, il convient de s'intéresser à quelques exemples d'adaptateurs clefs dans le contexte du système immunitaire.

4.1 Famille LAT

LAT (Linker for Activated T cell) est exprimé dans les cellules T et les cellules NK. LAT fait partie d'une famille comprenant trois autres membres récemment identifiés qui sont NTAL/LAB (Non-T-cell Activation Linker), LIME (Lck-interacting membrane protein) et PAG/Cbp (Protein Associated with glycosphingo-lipid-enriched microdomain) (98). Ce sont des molécules transmembranaires avec une longue queue cytosolique comportant de nombreuses

tyrosines qui peuvent être phosphorylées et qui sont capables de s'associer à des domaines SH2. Tous ces adaptateurs sont palmytolés sur deux cystéines et se retrouvent donc dans les radeaux lipidiques (lipid raft). LAT est un acteur essentiel de la signalisation des cellules T. Lors de l'engagement du TCR, les kinases de la famille Syk (Syk, Zap70) phosphorylent plusieurs tyrosines sur LAT qui permettent le recrutement d'effecteurs secondaires (Figure 1). La tyrosine Y136 recrute PLC γ 1, la tyrosine Y171 recrute Grb2/Gads et/ou la Pi3K, alors que les tyrosines Y191 et Y226 recrutent Grb2/Gads et/ou Vav. Suite à ces associations d'autres protéines viennent s'intégrer à ce complexe : SLP-76, Itk, Sos, Ras/MAPK qui induisent des signaux critiques dans la cellule T : libération de calcium intracellulaire, activation de facteurs de transcriptions. LAT est considéré comme un activateur essentiel des cellules T. Ainsi toute altération de la protéine soit par ablation (KO) soit par mutations ponctuelles sur les tyrosines citées ci-dessus conduit irrémédiablement à de profondes déficiences immunitaires (99-102). LAT semble aussi être impliqué dans la signalisation des cellules NK. Plusieurs groupes signalent notamment le recrutement de cet adaptateur au récepteur 2B4 (voir plus loin).

Le deuxième membre de la famille, NTAL, est exprimé dans les cellules B, les mastocytes et les cellules NK (103, 104). Après la stimulation du BCR ou les récepteurs Fc, NTAL devient phosphorylé et recrute Grb2 et Cbl. De manière intéressante, NTAL semble incapable de recruter PLC- γ . La génération de souris transgéniques pour NTAL dans un background LAT^{-/-} provoque une maladie autoimmune de type Th2 très similaire au phénotype observé dans les souris KI LAT^{Y136F} (104). Ces résultats démontrent que NTAL, d'une certaine façon peu remplacer LAT. Par ailleurs, la délétion de NTAL ne montre pas d'effet significatif sur l'activité des cellules B (105, 106). La fonction de NTAL dans les cellules B reste donc peu connue. Par opposition, les mastocytes des souris NTAL^{-/-} démontrent une hyperactivité suite à une stimulation des récepteurs Fc ϵ RI. La dégranulation, la libération de calcium, la production de cytokines et l'activation des MAPK sont augmentés suite à l'engagement de ce récepteur, démontrant le rôle inhibiteur de NTAL dans les mastocytes. Récemment une étude montre le rôle potentiel que

pourrait avoir NTAL dans les cellules T activées (107). En effet, bien que les premières études n'indiquent pas la présence de NTAL dans les cellules T (naïves), les auteurs de cette dernière étude suggèrent que NTAL serait exprimé dans les cellules T activées et participerait à leur régulation.

La fonction de PAG semble être différente de celle de LAT et NTAL. PAG est exprimé de façon ubiquitaire, et possède des tyrosines intracytoplasmiques qui peuvent être phosphorylées par les Src kinases. L'un des partenaires les plus importants pour la signalisation de PAG est Csk, une protéine tyrosine kinase impliquée dans la régulation négative des Src kinases (108-110). Dans les cellules T quiescentes, PAG semble être constitutivement phosphorylé par Fyn, ce qui assure une association de Csk sur la tyrosine Y314 via son domaine SH2. Suite à l'engagement du TCR, PAG devient rapidement déphosphorylé et libère ainsi Csk qui acquiert son potentiel inhibiteur sur les Src kinases, prévenant ainsi toute hyperactivation des cellules T (111, 112). Bien que PAG semble être un acteur important de la signalisation des cellules T, les souris déficientes pour PAG ne montrent peu ou pas de phénotypes notables (113, 114).

Le dernier membre de la famille est l'adaptateur transmembranaire est LIME. LIME est exprimé dans les cellules T et devient phosphorylé suite à l'engagement des corécepteurs CD4 ou CD8 (115, 116). LIME est associé à Lck, Fyn mais aussi Csk. Les études sur LIME montrent que l'adaptateur, lorsqu'il est phosphorylé, est capable de recruter des effecteurs activateurs tels que Grb2, Gads et la Pi3-Kinase. Parallèlement, la surexpression de LIME conduit à une augmentation de l'activité des MAPK et du promoteur de l'IL-2 suggérant que LIME est un régulateur positif des cellules T (115, 116).

4.2 SLP-76

La famille des adaptateurs SLP-76 (SH2-domain-containing Leucocyte-specific Phosphoprotein of 76 Kd) comprend trois membres : SLP-76, SLP-65 et CLNK (Cytokine-dependent hemopoietic cell linker) (117). SLP-76 est exprimé dans

les cellules T, les neutrophiles, les mastocytes et les plaquettes. SLP-65 se retrouve uniquement dans les cellules B. CLNK n'est exprimé que lorsque l'on expose certaines cellules hématopoïétiques (T, NK et mastocytes) aux cytokines (IL2, IL3). Dans les cellules T, SLP-76 est un grand adaptateur qui permet le lien signalitique entre LAT et les effecteurs en aval. Similairement à LAT, SLP-76 est une molécule cruciale pour le bon fonctionnement des cellules T. Il est à noter, que LAT et SLP-76 sont aussi nécessaires au développement des cellules T dans le thymus. Ainsi, des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces molécules provoquent un bloc complet de la différenciation des thymocytes. SLP-76 est phosphorylé sur différents motifs tyrosines par ZAP-70. Ces tyrosines sont alors capables de recruter Vav (Y112), Nck (Y128) et Itk (Y145), partenaires importants dans la régulation de la réorganisation du cytosquelette. Par ailleurs, le domaine central de SLP-76 riche en prolines s'associe aux domaines SH3 de PLC γ 1 et Gads, eux-mêmes déjà impliqués avec le complexe LAT. Finalement SLP-76 possède un domaine SH2 carboxy-terminal qui permet de recruter ADAP (Adhesion and Degranulation promoting adaptor protein) et HPK1 (Hematopoietic progenitor kinase 1) (118, 119). Ces associations ne semblent pas être cruciales pour la signalisation du TCR, mais pourraient être impliquées dans l'activation des intégrines (ADAP) et la modulation de la voie MAPK (HPK1).

4.3 Grb2/GADS

Un des premiers adaptateurs identifié fut Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein 2). Grb2 est exprimé ubiquitairement et a été initialement impliqué dans la signalisation du récepteur à l'EGF (120). Cette molécule est composée d'un domaine central SH2 et deux domaines SH3 (un en position C-terminale, l'autre en position N-terminale). Dans les fibroblastes, Grb2 s'associe, par son domaine SH3 avec Sos (Son of Sevenless) un facteur d'échange guanine nucléotide pour Ras et Rac. L'autophosphorylation du récepteur à l'EGF induit le recrutement des domaines SH2 de Grb2, et par là même Sos qui devient alors capable d'activer la voie Ras. Dans les cellules T, Grb2 joue un rôle similaire : le domaine SH2 s'associe aux

tyrosines phosphorylées de LAT suite à la stimulation du TCR. Dans ce cas aussi Grb2 recrute Sos qui stimule la voie Ras/MAPK. La protéine Gads (Grb2-related Adaptor protein), surtout exprimée dans les cellules hématopoïétiques, a été identifiée comme étant de la même famille que Grb2. Bien que Gads contienne aussi un domaine SH3 et deux domaines SH2, cette molécule possède un domaine additionnel unique riche en prolines. Dans les cellules T, Gads s'associe constitutivement, via son domaine SH3, à SLP-76. L'engagement du TCR induit le recrutement de Gads à la molécule LAT phosphorylée, formant ainsi le complexe LAT-Gads-SLP-76. Comme mentionné précédemment, la formation de ce complexe est nécessaire pour l'activation des cellules T.

4.4 Les molécules Cbl

Bien que les molécules Cbl ne soient pas de réels adaptateurs, je me permets de les présenter dans cette section afin de faciliter la compréhension du chapitre II. Chez les mammifères, la famille Cbl compte trois membres : c-Cbl, Cbl-b et Cbl-3 (121). Les deux premiers membres de la famille sont très fortement exprimés dans les tissus hématopoïétiques, alors Cbl-3 se retrouve plutôt au niveau de l'intestin, des reins, du pancréas et de la prostate. Ces molécules sont des E3 ubiquitines ligases capables de recruter des E2 ou enzymes transporteurs d'ubiquitines (UBC) (122). Cette capacité de s'associer aux E2 permet le transfert d'ubiquitines sur des substrats qui interagissent avec les molécules Cbl. Une fois les substrats ubiquitinés, ils sont envoyés dans la voie endosomale ou lysosomale pour recyclage ou dégradation respectivement. La fonction d'E3 ubiquitine ligase est dépendante d'un domaine interne que l'on nomme le domaine RING. La partie N-terminale des molécules Cbl est composée du domaine tyrosine-binding-kinase (TBK) qui comprend une section 4H (four-helix bundle), un domaine EF capable de s'associer au calcium et un domaine SH2 (123). Les domaines TBK et RING sont très conservés entre les différents membres de la famille. Les molécules Cbl pourraient être aussi considéré comme des adaptateurs, en ce sens qu'elles sont capable de recruter de nombreuses

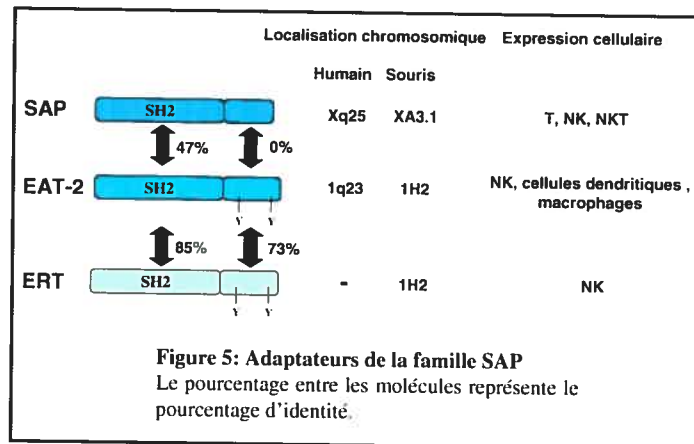
molécules. Parmi les molécules recrutées on note des kinases (Syk kinases, Src kinases, la PI3-kinase, des récepteurs tyrosines kinases comme le PDGFR ou l'EGFR) (124-128) et des adaptateurs (Grb2, Nck, CrkL). Les premières études démontrant la fonction des protéines Cbl sont venues des observations concernant SLI-1 l'homologue chez *C.elegans* où il apparaît que les molécules Cbl sont des régulateurs négatifs des récepteurs tyrosines kinases (RTK) (129, 130). Chez les RTK, les molécules Cbl induisent leur internalisation par ubiquitination suite à une stimulation par leurs ligands. Ce phénomène physiologique permet de réguler la durée de stimulation de ces récepteurs et d'éviter tout signal prolongé et donc potentiellement cancérigène. Les molécules c-Cbl et Cbl-b se sont montrées essentielles dans la signalisation des cellules immunes. c-Cbl est particulièrement importante pour le développement des thymocytes alors que Cbl-b se révèle critique dans la régulation de l'activation des cellules T périphériques matures (131-134). Les souris déficientes pour c-Cbl démontrent une élévation de l'expression des récepteurs de surface (TCR, CD3, CD4 et CD5) et une activation non physiologique (découplage du signal entre le TCR et CD4) de la kinase ZAP-70 dans les thymocytes. Chez les souris Cbl-b^{-/-} le développement des cellules T est normal, mais ces souris développent des maladies autoimmunes dues à une hyperactivation chronique des cellules T (la production d'IL-2 est augmentée et le coengagement entre le TCR et CD28 n'est plus requis pour obtenir une stimulation maximale). Dernièrement, l'étude de la double inactivation génétique de c-Cbl et de Cbl-b dans les cellules B, démontre que ces molécules sont essentielles pour maintenir la tolérance dans ce type cellulaire (135).

En résumé, les molécules Cbl sont des importants régulateurs des voies de signalisation par leur capacité à dégrader ou contrôler des effecteurs activateurs essentiels.

5. Les adaptateurs de la famille SAP

5.1. Nomenclature et structure générale

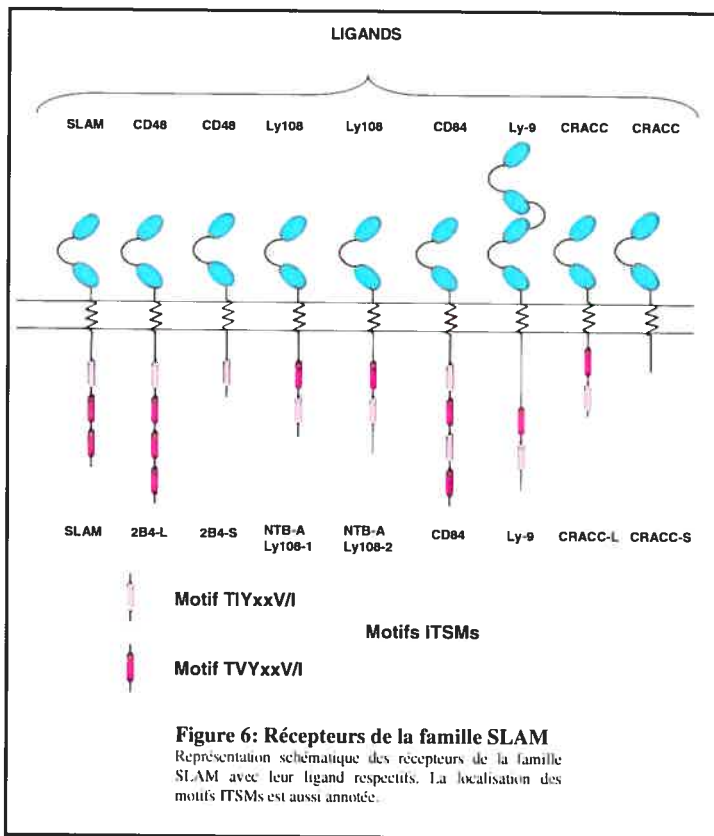
La famille des adaptateurs SAP comprend trois membres chez la souris: SAP, Ewing'sarcoma-activated transcript-2 (EAT-2) et EAT-2 related transducer (ERT). Les gènes qui codent pour ces protéines se nomment respectivement : *Sh2d1a*, *Sh2d1b*, *Sh2d1c*. *Sh2d1a* est localisé sur le chromosome X, alors que *Sh2d1b/Sh2d1c*



se situent sur le chromosome 1 (1H2) proche du locus (1300 Kb) qui code pour les récepteurs de la famille SLAM. Chez l'humain, on retrouve seulement (aux mêmes localisations chromosomiques que chez la souris) SAP et EAT-2. L'organisation de ces gènes est très similaire. Elle consiste en quatre exons séparée par trois introns. Ces adaptateurs sont des petites protéines d'environ 130 acides aminés (126 pour SAP, 132 pour EAT-2 et ERT) qui comprennent essentiellement un domaine SH2 et une courte queue carboxy-terminale (Figure 5).

5.2. SAP et XLP

L'XLP (aussi appelée maladie de Duncan ou syndrome de Purtilo) (incidence : 1/500000) est une immunodéficiency primaire qui se caractérise par une susceptibilité accrue des malades à l'EBV. Cette maladie fût rapportée pour la première fois en 1975 par Purtilo et collègues (136) décrivant le cas d'une famille dans laquelle six garçons décédèrent d'une immunodéficiency associée à une prolifération aberrante des cellules T et des macrophages. Par la suite, l'étude de



plusieurs cas révéla une considérable hétérogénéité dans les phénotypes observés. Classiquement les patients développent une mononucléose infectieuse (Fulminant infections mononucleosis, FIM) (50% des cas), des lymphomes B extra-nodaux non Hodgkinien (30% des cas) ainsi qu'une dysgammaglobulinémie (30% des cas) (137-139). Les patients atteints de l'XLP décèdent pour la

plupart dans leurs premières années de vie (âge moyen : 3 ans) quelques semaines après une infection primaire par l'EBV. Ils développent une prolifération massive et incontrôlée de lymphocytes T et B qui, après infiltration, provoque une nécrose du foie et un dysfonctionnement de la moelle osseuse. Cette catégorie de malades développent pour la plupart une FIM caractérisée par de la fièvre, une lympho-

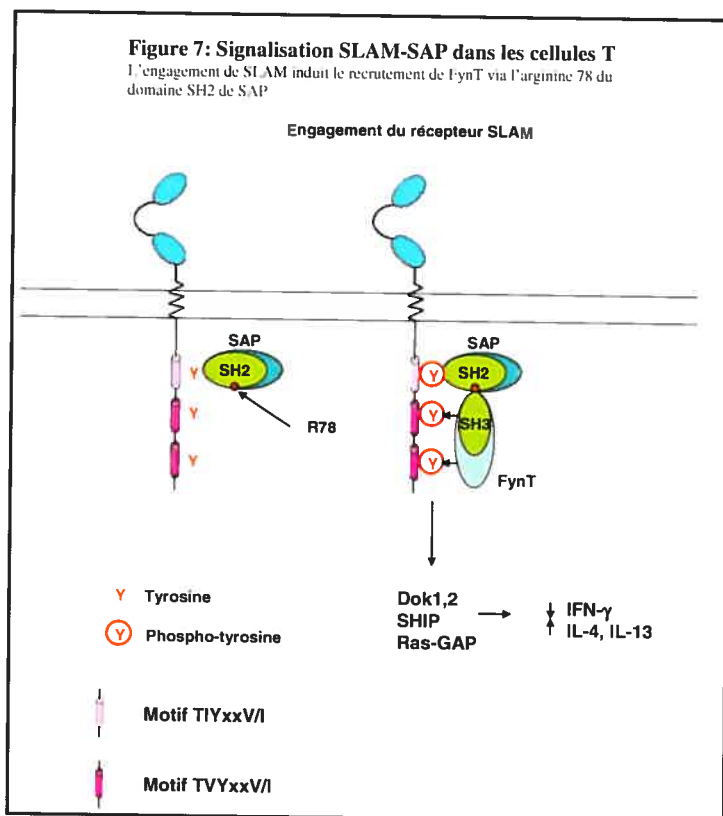
adénopathie et une hépato-splénomégalie. Certains patients ne montrent pas de signes précoces de maladie, et parviennent ainsi à atteindre l'âge adulte. Pour ces patients, on observe le développement d'infections à répétition caractérisées par une dérégulation des niveaux d'immunoglobulines dans leur sang; habituellement ces patients n'atteignent pas l'âge de 40 ans. Il semble donc que le tableau clinique soit très variable d'un individu à un autre, suggérant ainsi l'existence de multiples dysfonctionnements de la réponse immunitaire.

L'une des avancées majeures dans la compréhension de cette maladie a été rendue possible grâce à l'identification du gène muté chez les patients atteints de l'XLP. En effet, en 1998, deux groupes indépendants décrivent le gène *Sh2d1a* comme étant responsable des phénotypes de familles atteintes de l'XLP (140, 141). De nombreuses études consécutives confirment des mutations ponctuelles dans ce gène à différentes localisations, provoquant des pertes de fonctions et d'expression de la protéine SAP. Suite à cette observation, des études subséquentes démontrent que la fonction de SAP est dépendante de son association aux récepteurs de la famille SLAM (142) (Figure 6).

La protéine SAP est exprimée majoritairement dans les cellules T, les cellules NK et dans les NKT (Figure 5). Quelques groupes reportent aussi l'expression de cette protéine dans les cellules B {Mikhalap, 2004} bien que ceci reste à confirmer. La complexité de la physiopathologie de l'XLP pourrait donc rendre compte des dysfonctionnements des différents types cellulaires ci-dessus.

5.2.1 SAP dans les cellules T

5.2.1.1 Signaux SLAM dépendants



Afin de comprendre le fonctionnement de SAP dans les cellules T, il est nécessaire de s'intéresser au récepteur SLAM dans un premier temps. Cette molécule fut initialement identifiée comme un récepteur stimulateur des cellules T, qui semblait opérer indépendamment du TCR (143). En fait, de nombreuses études subséquentes révèlent plus un caractère modulateur de

ce récepteur dans un contexte Th1/Th2. Par ailleurs, il est à noter, que SLAM semble être le récepteur majeur du virus de la rougeole (144). SLAM possède trois motifs tyrosines (Y288, Y315 et Y335) dans son domaine intra-cytoplasmique. Les premières études *in vitro* suggéraient que SAP pouvait jouer le rôle d'un adaptateur bloquant, venant compétitionner une interaction entre SLAM et SHP-2 (142, 145). Des études réalisées avec des cellules T montrent qu'en fait SAP est constitutivement associé au premier motif tyrosine (Y288) de SLAM, via son domaine SH2 (146, 147). Cette interaction est exceptionnelle, puisque dans ce cas, le domaine SH2 de SAP peut reconnaître la tyrosine de manière phospho-indépendante. L'engagement de SLAM (par lui-même) induit une modification de conformation de sa partie intra-

cytoplasmique qui permet à la première tyrosine de devenir phosphorylée (probablement par les Src kinases). L'affinité entre le domaine SH2 de SAP et le premier motif tyrosine de SLAM est alors nettement augmentée (constantes de dissociation : 600-700 nM et 180 nM respectivement). Il est probable que suite à cette phosphorylation, la conformation de SAP soit modifiée (148). Nos études montrent que SAP devient alors capable de recruter la Src kinase FynT (Figure 7) (149). Le domaine SH2 de SAP grâce à un motif arginine (RFFR⁷⁸KVKN : ce motif est centré sur l'arginine R⁷⁸), localisé entre le sixième feuillet β et la seconde hélice α , recrute le domaine SH3 de FynT (ces résultats sont traités en détail dans le chapitre II) (150, 2003). De telles interactions entre les domaines SH2/SH3 sont très rares, d'où leur caractère exceptionnel. Un autre exemple d'interaction entre un domaine SH3 et une région proline indépendante a été documenté pour les adaptateurs Gads et SLP-76. Dans ce cas, le domaine SH3 de Gads reconnaît la séquence RxxK de SLP-76 (151).

Dans leur état inactif, les Src kinases adoptent une conformation tridimensionnelle repliée dans laquelle le domaine SH2 est associé à la tyrosine inhibitrice pY527 (152, 153). La déphosphorylation de cette tyrosine par une phosphatase (par exemple CD45 pour Lck) ou l'induction d'une association avec leurs domaines SH2/SH3 par un ligand externe induit l'activation des Src kinases (64, 154, 155). De plus, cette forme active est maintenue par une autophosphorylation de la tyrosine Y416 localisée dans la boucle d'activation du domaine catalytique (156). Lorsque SAP recrute le domaine SH3 de FynT, la kinase s'ouvre et devient active. FynT phosphoryle alors les deux autres motifs tyrosines (Y315, Y335) de SLAM, ce qui permet au domaine SH2 de la kinase de s'associer à la partie C-terminale du récepteur. C'est certainement un phénomène dynamique qui s'auto-amplifie après la première stimulation. Ainsi, suite à la formation du complexe SLAM-SAP-FynT, le récepteur est alors capable de recruter les effecteurs secondaires SHIP, Dok1 et Dok2 qui deviennent actifs de part la proximité des Src kinases (149). Toute cette signalisation a été confirmée par l'utilisation de souris SAP déficientes (SAP⁻) ou de souris knockin (KI) pour SAP dont l'arginine 78 a été mutée en alanine (SAP^{R78A}) (150, 157). Dans ces deux cas FynT est incapable d'être recrutée au récepteur SLAM,

il en résulte une perte totale de toute signalisation ultérieure. Il est à noter que cette signalisation est totalement indépendante du TCR.

Une autre étude évoque un autre type de signalisation, dans le cadre d'une co-stimulation avec le TCR (158). Lors d'une co-ligation TCR-SLAM, les auteurs observent une augmentation du recrutement de la PKC θ (Protein Kinase C- θ) et de BCL-10 (B-Cell Lymphoma 10) à la synapse immune de la cellule T. La PKC θ est une protéine importante pour l'activation des facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1 ou NFAT (159). De manière intéressante, la souris PKC $\theta^{-/-}$ démontre un important défaut dans la génération d'effecteurs Th2. Bien que la translocation de la PKC θ soit dépendante de Lck (160) il semblerait que l'altération de Fyn ou de SAP affecte le recrutement de la PKC θ à la synapse. Il en résulte une réduction de l'activation des effecteurs en aval de la PKC θ tel que IkK et Bcl-10. Ultiment, les auteurs suggèrent que ce signal influencerait l'activation du facteur de transcription GATA-3 et donc la génération d'effecteur Th2.

La souris SAP déficiente, mentionnée ci-dessus, a permis de mieux comprendre les mécanismes immuns dans lesquels SAP est impliqué (161, 162). Cette souris présente de nombreux défauts dans sa réponse immune. Ainsi, après une infection de ces souris avec le virus de la chorioménigite lymphocytaire (LCMV), on dénote une augmentation du nombre de cellules CD8 $^{+}$ dans la rate et le foie. Les cellules T, CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ produisent aussi de plus grande quantité d'IFN- γ suggérant un rôle de SAP dans la polarisation Th1/Th2. Un modèle connu de réponse Th1/Th2 dans les souris, utilise le parasite intracellulaire *Leishmania major* (LM). Ainsi, des souris développant des réponses Th1 (C57BL/6) sont plus résistantes à LM comparées à des souris orientées Th2 (Balb/c). En utilisant ce modèle, les auteurs ont démontré l'incapacité des cellules T des souris SAP déficientes à se différencier en Th2. La production d'IL-4 est nettement diminuée, ce qui corrèle avec les faibles niveaux d'IgE. La déficience en SAP confère donc la résistance à l'infection par LM. Ces premières études suggèrent donc que SAP est impliqué dans l'induction Th2 des cellules T.

Les études successives sur les cellules CD4⁺ naïves confirment ce phénotype. Ces cellules issues des SAP⁻ ou de SAP^{R78A} produisent peu ou pas d'IL-4 et d'IL-13 (cytokines Th2 caractéristiques) en réponse à la stimulation du TCR (157, 158). Comme évoqué précédemment, ceci se caractérise par une réduction importante du niveau d'IgE et d'IgG *in vivo*, conséquence de la déficience de l'activation et de la commutation isotypique des cellules B. Parallèlement, on note une réduction de la formation des centres germinaux (lieux d'activation des cellules B) et du nombre de cellules B mémoires (163-165). Ces études indiquent que le défaut des cellules B serait seulement une conséquence secondaire résultant de l'incapacité des cellules T CD4⁺ à produire des cytokines de type Th2. Ainsi le transfert d'un mélange de cellules T CD4⁺ SAP⁻ et de cellules B d'une souris normale dans un hôte irradié est suffisant pour reproduire les défauts immuns cités précédemment. Récemment, une étude suggère que les cellules T CD4⁺ des souris SAP déficientes expriment des niveaux augmentés du récepteur CD40L et un retard de l'induction de l'expression d'ICOS (inducible costimulator) (166). Ces deux molécules sont impliquées dans des interactions cellules T-cellules B. Le contrôle de l'expression au niveau quantitatif et temporel de ces molécules est essentiel à la formation des centres germinaux, à la commutation isotypique et à la coactivation des cellules B (167-170). Tout dérèglement de ces mécanismes conduit à de sévères défauts de la réponse immune (171). Il faut noter qu'une diminution d'expression d'ICOS a été également observée chez les patients atteints de l'XLP (172). Tous ces résultats démontrent donc que l'expression de SAP dans les cellules T CD4⁺ régule de manière indirecte, soit par la production de cytokines, soit par la modulation de corécepteurs, l'activation des cellules B.

Comme énoncé précédemment la signalisation de SAP dans les cellules T est hautement dépendante du récepteur SLAM. Pour examiner plus finement les signaux SLAM-SAP, les réponses des cellules T de souris SLAM déficientes ont été comparées à celles des SAP KO. Les cellules T CD4⁺ des souris SLAM^{-/-} démontrent un phénotype similaire à celui des cellules SAP⁻, c'est-à-dire une diminution de production des cytokines de type Th2 (157). Il est néanmoins important de

mentionner que l'expression de SLAM n'apparaît qu'après l'activation des cellules T périphériques, alors que SAP est exprimé en grande quantité dans les cellules T naïves. Il convient donc de considérer que SAP pourrait induire un signal SLAM indépendant dans les cellules T (voir section 5.2.1.2).

Le rôle de SAP dans les cellules T CD8⁺ reste plus obscur. Comme mentionné précédemment, les premières études sur les souris SAP déficientes démontraient une augmentation du nombre de cellules CD8⁺ suite à une infection par le LCMV (161). Plus récemment, les mêmes auteurs ont observé une augmentation de la prolifération des cellules T CD8⁺ des souris SAP⁻ comparée au SAP⁺ après stimulation par les anticorps anti CD3/CD28 (173, 174). Parallèlement, il semblerait que les cellules T CD8⁺ des souris SAP⁻ produisent plus d'IFN- γ comparées aux cellules sauvages suite à une infection par le virus de l'herpes γ -68 murin (MHV-68). Bien que ces deux études aient analysé de manière similaire les CD8⁺ après une infection à MHV-68, leurs conclusions demeurent contradictoires. Dans un cas l'augmentation du nombre et de l'activité des cellules CD8⁺ permet un meilleur contrôle du virus (173), dans l'autre cas, elle induit une infiltration massive disséminée qui conduit à une destruction des tissus environnants (174). En fait, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype restent encore nébuleux. En effet les fonctions de SAP dépendantes du récepteur SLAM ont été peu étudiées dans les cellules CD8⁺. Bien que SLAM soit aussi induit après activation sur les cellules T CD8⁺ (175), il est difficile de distinguer sa fonction par rapport aux autres membres SRR (voir section suivante). Néanmoins, l'étude traitant de l'analyse des souris SLAM déficientes suggère que le récepteur serait aussi impliqué dans l'inhibition de la production d'IFN- γ dans les T CD8⁺. Finalement, les souris SAP et SLAM déficientes nous indiquent le rôle modulateur de ces molécules dans la production des cytokines de type Th1 dans les cellules T CD8⁺.

Ces observations contrastent avec les résultats obtenus chez les patients XLP qui démontrent un défaut de cytotoxicité des cellules T CD8⁺ contre des cibles EBV positives (176-178). En effet, à la différence de la souris, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) de patients prolifèrent et produisent une quantité normale de cytokines en réponse à des stimulations classiques (anti-CD3/CD28, TPA/iono). Par

ailleurs, ces cellules sont aussi capables de contrôler l'expression des SRR tels que SLAM ou 2B4. En fait, de manière surprenante et comme nous le verrons plus loin, ces études associent le défaut de cytotoxicité à une dérégulation de la signalisation médiée par 2B4. En conclusion, la compréhension de la régulation des cellules T CD8⁺ par SAP reste tout de même superficielle et incomplète.

5.2.1.2 SAP et les autres membres de la famille SLAM

5.2.1.2.1 2B4 (CD244)

De récentes études ont porté sur d'autres membres de la famille SLAM exprimés dans les cellules T. Le plus étudié d'entre eux est certainement 2B4 (CD244) qui est le seul à interagir avec un ligand distinct (CD48). 2B4 est exprimé dans les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺, dans les cellules T $\gamma\delta$ et aussi dans les cellules NK et NKT (voir sections NK/NKT) (179-182). On distingue chez la souris deux isoformes de 2B4, un long (2B4-L) et un court (2B4-S) qui possèdent soit sept soit deux motifs tyrosines intracytoplasmiques respectivement. Seuls quatre de ces motifs sont des ITSMs potentiellement capables de s'associer aux adaptateurs de la famille SAP (Figure 6). Les premières études suggèrent que 2B4-S aurait un rôle activateur alors que 2B4-L induirait un signal d'inhibition (183). D'autres études plus récentes présentent 2B4 comme un récepteur de costimulation dans les cellules T. En effet, l'expression de 2B4 sur les cellules T CD8⁺ n'apparaît qu'après activation et reste surtout associée à un phénotype de cellules T mémoires. De plus l'interaction 2B4-CD48 entre cellules T CD8⁺ adjacentes induit une augmentation de la prolifération et de la cytotoxicité CMH-restreint (184, 185). L'association de SAP à 2B4 dans les cellules T de la souris n'a pas été démontrée formellement, il faut cependant noter que cette interaction survient dans des systèmes hétérologues et dans les cellules T CD8⁺ humaines (186, 187). L'étude de la souris 2B4 déficiente (2B4^{-/-}) ne montre qu'un phénotype mineur au niveau des cellules T; celui-ci se réduit à une augmentation du nombre de doubles négatifs (CD8⁻CD4⁻) seulement chez les souris

femelles (188). Le phénotype le plus dominant du 2B4^{-/-} se retrouve au niveau des cellules NK (voir section NK). On ne dénombre aussi que peu d'études sur le rôle de 2B4 dans les cellules T CD8⁺ humaines. Comme mentionné précédemment, les patients XLP démontrent un défaut de cytotoxicité de leurs cellules T CD8⁺. La plupart des études associent cette anomalie à une dérégulation du signal induit par 2B4 (177, 178). En effet on observe que les cellules T CD8⁺ de patients XLP ne sont plus aptes à lyser des cellules cibles EBV⁺ exprimant le ligand de 2B4, CD48.

5.2.1.2.2 Ly108

Ly108 (NTB-A chez l'humain) n'a été que très peu étudié dans les cellules T. Ly108 existe sous deux isoformes (Ly108-1 et Ly108-2) qui diffèrent par la taille de leur queue cytoplasmique (189). Ly108-1 et Ly108-2 possèdent deux motifs ITSMs (Figure 6). L'isoforme Ly108-2 plus long ne possède pas les quatre derniers acides aminés carboxy-terminaux qui sont remplacés par une séquence de 24 amino-acides contenant un motif tyrosine de type Yxxv. Chez l'humain, les premières études suggèrent que la stimulation de NTB-A et de CD3 (en l'absence de CD28) par des anticorps induit la prolifération des cellules T ainsi qu'une augmentation de la production d'IFN- γ (190). Cette étude souligne aussi l'importance de NTB-A dans la commutation isotypique de type Th1 (IgG2a, IgG3). Paradoxalement, la génération de la souris Ly108 déficiente démontre un rôle différent pour ce récepteur (191). En effet, les auteurs décrivent une diminution de la production de cytokines Th2 (IL-4) par les cellules T suite à leur stimulation. Au niveau moléculaire, SAP semble pouvoir interagir avec NTB-A après stimulation du TCR dans les cellules T humaines (190). La corrélation entre cette association et le rôle physiologique de Ly108 reste de tout même incertaine. De plus, les disparités de résultats entre l'humain et la souris ne permettent pas de tirer des conclusions sur le rôle de ce récepteur dans les cellules T.

5.2.1.2.3 Ly9 (CD229)

Ly9 (CD229), un autre récepteur de la famille SLAM, est aussi exprimé dans les cellules T. Contrairement aux autres SRR, Ly9 possède quatre domaines Ig extracellulaires et une queue cytoplasmique de 180 amino-acides (Figure 6). On retrouve dans le domaine intracytoplasmique deux motifs tyrosines ITSMs capables d'associer SAP ou EAT-2 lorsqu'ils sont phosphorylés (192). Il faut néanmoins noter que ces interactions ont été réalisées dans des systèmes hétérologues et n'ont pour l'instant pas été associées à des réponses physiologiques. Récemment la souris Ly9 déficiente a été générée et comparée aux souris SAP^{-/-} et SLAM^{-/-} (193). L'étude des cellules T révèle un léger défaut dans la production de cytokines de types Th2 (IL-4), ainsi qu'une diminution de la prolifération après stimulation. Le phénotype peu prononcé qui est observé pourrait s'expliquer par la redondance des SRR et en particulier par l'effet dominant de SLAM. Parallèlement, à cette étude, un autre groupe a décrit une fonction de Ly9 SAP indépendante dans les cellules T (194). En effet, dans le cas d'un coengagement de Ly9 avec le TCR, CD229 peut recruter Grb2 sur le motif tyrosine Y606 (motif : pYxNx) distinct de celui requis pour l'interaction avec SAP. Cette association semble, contre toute attente inhiber la stimulation induite par le TCR et plus particulièrement la voie des MAPK. Toutefois, le rôle de cette modulation dans la signalisation du TCR reste inconnu. Finalement, Ly9 semble aussi posséder une fonction unique par rapport aux autres membres SRR. En effet, Ly9 est capable d'interagir avec AP-2 grâce au motif Y(470)EKL (195). Cette association induit l'internalisation du récepteur à la suite de son engagement via des puits à clathrines. La relation de cette observation avec les adaptateurs de la famille SAP n'est pas connue, mais pourrait définir une fonction spécifique à Ly9.

5.2.1.2.4 CD84

CD84 est exprimé dans de nombreux types cellulaires hématopoïétiques incluant les cellules T (196). CD84 possède deux motifs ITSMs dans son domaine intracytoplasmique (Y262, Y298 chez l'humain) (Figure 6). Ces deux tyrosines deviennent phosphorylées suite à son engagement par des anticorps ou par une interaction homotypique. L'étude biochimique de CD84 dans des cellules T déficientes pour Lck démontre un défaut de phosphorylation suggérant le rôle de cette kinase dans l'initiation du signal intracellulaire du récepteur (197). Les mutations des deux tyrosines Y262 et Y298 en phényalanine abolissent la phosphorylation du récepteur, mais seule la mutation de la tyrosine Y262 affecte l'interaction entre SAP et CD84. De manière intéressante, il semblerait que l'association de SAP au récepteur ne soit pas requise pour la phosphorylation de CD84. Les patients XLP n'ont donc pas de défaut au niveau de la phosphorylation du récepteur. Ainsi de manière consistante, la stimulation de CD84 augmente la prolifération des cellules T activées indépendamment de SAP (les cellules des patients XLP répondent normalement en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3+ anti-CD84). Les quelques d'études consacrées à ce récepteur ne permettent pas de conclure définitivement sur son rôle dans les cellules T.

5.2.2 SAP dans les cellules NK

L'expression de SAP dans les cellules NK varie en fonction de leur état d'activation et de maturation. Ainsi, chez la souris SAP est seulement exprimé dans les cellules NK matures et plus particulièrement dans les LAK (198). Chez l'humain, seules les cellules NK matures et totalement différenciées expriment SAP (199). Comme dans les cellules T, les fonctions connues de SAP dans les cellules NK sont très dépendantes des récepteurs de la famille SLAM. Les cellules NK de souris expriment trois membres des SRR : 2B4, CRACC et CD84. Chez l'humain, on

observe aussi l'expression de NTB-A. Il convient donc de s'intéresser de plus près aux différents SRR présents à la surface des cellules NK.

5.2.2.1 2B4 et SAP dans les cellules NK

2B4 est depuis longtemps considéré comme un récepteur activateur des cellules NK. Son engagement mène à une augmentation de la fonction cytotoxique et à la production d'IFN- γ par les cellules NK (179, 181, 200). On constate ce phénomène soit en utilisant des anticorps anti-2B4 ou en mettant en présence les cellules NK avec des cibles exprimant le ligand de 2B4, CD48 (182, 201). Lorsque la partie intracytoplasmique de 2B4 est phosphorylée, SAP est capable de s'y associer et d'induire un signal intracellulaire (187, 202, 203). La nature du signal délivré (au niveau moléculaire) reste encore controversée et dans ce contexte il faut distinguer la fonction de 2B4 SAP-dépendante chez l'humain de celle observée chez la souris.

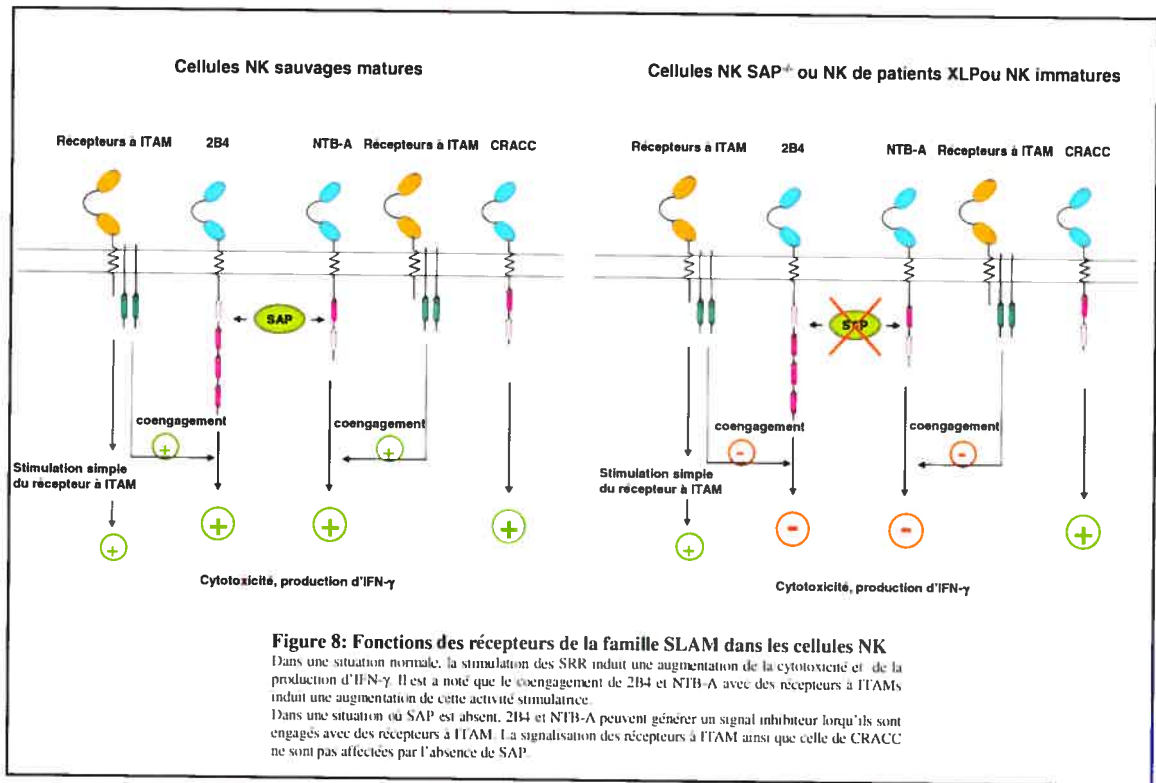
De nombreuses études se sont intéressées à la fonction des cellules NK chez les patients XLP. On note tout d'abord que le développement des cellules NK semble normal chez ces patients. Par ailleurs, la fonction cytotoxique et la production d'IFN- γ associées à des récepteurs non SRR ne semblent pas être affectées par l'absence de SAP (204, 205). En revanche, l'activité cytotoxique dépendante de 2B4 des NK de patients XLP est nettement réduite par rapport à celle des individus normaux. Ce phénotype est particulièrement évident lorsqu'on utilise des cibles CD48⁺ contre lesquelles les NK des patients XLP n'exercent plus aucune fonction de lyse. De plus, et de manière très intrigante, le co-engagement de 2B4 avec d'autres récepteurs activateurs chez les patients XLP induit une inhibition de ces dits récepteurs (205) (Figure 8). Enfin, ce rôle inhibiteur est aussi observé au cours des étapes précoces de la différenciation des cellules NK. Les cellules NK immatures, à la manière des patients XLP, expriment le récepteur 2B4 mais pas encore SAP (199). Ces observations impliquent que 2B4 pourrait avoir un rôle inhibiteur en l'absence de SAP. Le mécanisme relatif à cette inhibition n'est pas encore clairement élucidé, mais

certaines études proposent que 2B4 en l'absence de SAP, puisse recruter des molécules inhibitrices telles que SHP-1 et SHP-2 (voir ci-dessous) (187, 206). Finalement, une étude récente montre que l'induction d'une cytotoxicité maximale requiert le co-engagement de 2B4 avec d'autres récepteurs activateurs tels que NKG2D, NKp46 ou CD16 (207). Cette dernière observation, suggère que 2B4 pourrait se comporter davantage comme un corécepteur dans les cellules NK humaines.

Chez la souris, une seule étude a porté sur le phénotype de cellules NK dans les souris SAP⁻ (56). Ces cellules révèlent de profonds défauts dans leur capacité de lyse, en particulier pour des cellules cibles qui expriment CD48. Parallèlement, la production d'IFN- γ en réponse à l'engagement de 2B4 est également diminuée. Un autre aspect de cette étude souligne le rôle de CD48 dans l'activation du complexe 2B4-SAP. CD48 est exprimée non seulement sur certaines cellules cibles mais aussi sur les cellules NK elles-mêmes. Une des grandes questions restant encore en suspens est de savoir si CD48 en étant exprimée sur les cellules cibles augmente ou diminue la capacité de lyse des cellules NK. Cette question sous-tend une autre énigme à savoir la fonction de l'interaction 2B4-CD48 entre cellules NK. Sur ces points, Bloch-Queyrat et collègues proposent que l'expression de CD48 sur les cibles augmente leur susceptibilité à la lyse par les NK, alors que d'autres études suggèrent un effet inverse (198, 208). Une partie des réponses a certainement été apportée par la création de la souris 2B4^{-/-}. De façon surprenante, les cellules NK 2B4^{-/-} démontrent une meilleure capacité à tuer des cibles CD48 positives *in vitro* et *in vivo* (188, 198, 209). Ces résultats, chez la souris, montrent donc que 2B4 peut générer un signal intracellulaire inhibiteur contredisant ainsi toutes les premières études portant sur ce sujet. Il faut par contre les rapprocher des résultats obtenus chez les patients XLP qui montrent aussi une certaine inhibition lorsque 2B4 est coengagé avec d'autres récepteurs activateurs. En résumé, 2B4 peut avoir deux rôles chez les souris : une fonction activatrice SAP dépendante et une fonction inhibitrice dont le mécanisme n'est pas connu. Le chapitre III permet en fait de répondre en partie au paradoxe du rôle de 2B4 dans les cellules NK. Finalement je discuterai dans le chapitre IV des

différents modèles qui peuvent être proposés pour expliquer la régulation de l'activité des cellules NK par 2B4 et SAP.

De nombreux effecteurs secondaires semblent être associés ou activés suite à la formation du complexe 2B4-SAP. Ainsi certaines études évoquent Dok1, LAT, PLC γ 2, la PI3-Kinase ou encore Vav (203, 210-213). Bien que certaines de ces protéines puissent expliquer le rôle activateur de 2B4 via SAP, la signification physiologique de ces interactions demeure guère étudiée. De plus l'étude de cellules NK des souris déficientes pour ces effecteurs ne montrent pas de différence pour la fonction de 2B4 (les NK LAT déficientes ne montrent pas de phénotype) (214) ou se retrouvent impliqués dans de nombreuses autres signalisations indépendantes de 2B4-SAP (comme par exemple l'enzyme PLC γ 2). Dans ce contexte, on observe une diminution de la phosphorylation et donc probablement de l'activation de ces effecteurs dans les cellules NK de patients XLP. Il est donc plausible que certaines de ces molécules jouent un rôle dans la signalisation de 2B4, mais il reste à déterminer leur importance et leur nécessité relative dans ce système. Comme évoqué ci-dessus, 2B4 semble être capable de générer un signal inhibiteur dans certaines conditions. Le mécanisme de ce rôle inhibiteur reste inconnu, mais pourrait être relié au recrutement de tyrosines phosphatases telles que SHP-1 ou SHP-2. Parallèlement, la Src kinase FynT semble pouvoir s'associer au complexe 2B4-SAP vraisemblablement par l'arginine R78 du domaine SH2 de SAP (203). Bien que la nécessité et l'exclusivité de cette association par rapport aux autres Src kinases n'ont pas été formellement démontrées, l'analyse des NK de la souris FynT^{-/-} révèle un dysfonctionnement de la fonction cytolytique à l'égard de cibles CD48 positives. Mais comme décrit précédemment, les cellules NK de cette souris possèdent aussi d'autres dysfonctionnements qui pourraient interférer dans la voie 2B4-SAP (voir section 2.2.3.1).



5.2.2.2 NTB-A dans les cellules NK

On observe de nombreuses similitudes entre NTB-A et 2B4 dans les cellules NK. En effet l'engagement de NTB-A conduit à la production d'IFN- γ et à l'induction de la cytotoxicité (215, 216) (Figure 8). Comme 2B4, la costimulation de NTB-A avec d'autres récepteurs activateurs exprimés sur les cellules NK est requise pour obtenir la réponse cytotoxique maximale. Par ailleurs, SAP est capable de s'associer à NTB-A, et cette interaction est dépendante de la phosphorylation du récepteur. SAP semble essentiel pour provoquer le signal de NTB-A puisque les patients XLP démontrent une incapacité à lyser des cibles en RADCC. D'une façon similaire à 2B4, le co-engagement de NTB-A avec d'autres récepteurs activateurs en l'absence de SAP (patients XLP), mène à une réduction de l'effet cytotoxique des NK (Figure 8). Dans ce cas aussi, le phénomène pourrait s'expliquer par la capacité de NTB-A à recruter SHP-1 et SHP-2. Jusqu'à présent aucune étude n'a montré l'expression de NTB-A dans les cellules NK de souris. Il est donc possible qu'il

existe une importante différence de fonction pour ce récepteur entre la souris et l'homme.

5.2.2.3 CRACC

Les études sur CRACC ont investigué le récepteur chez l'humain; il est donc possible que les fonctions décrites ci-dessous ne s'appliquent pas complètement au modèle murin. CRACC est exprimé sur les cellules CD8⁺, CD4⁺, NK, les cellules B et les cellules dendritiques activées (217). On observe deux isoformes de la molécule, un court et un long (Figure 6). Ces isoformes possèdent respectivement aucun ou deux motifs ITSMs dans leur domaine intracytoplasmique (218). Malgré ces motifs, CRACC ne semble pas être capable de recruter SAP, et de manière consistante, les fonctions de CRACC ne sont pas affectées chez les patients XLP (Figure 8). La stimulation de CRACC par RADCC augmente la capacité de lyse des cellules NK. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'expression de CRACC sur des cellules cibles induit aussi une augmentation de la cytotoxicité (216). On ne possède finalement que peu d'informations concernant ce récepteur et sa relation éventuelle avec SAP; il est probable que la modulation de l'expression des différents isoformes ait un rôle dans la régulation spatio-temporelle du signal délivré par ces molécules.

5.2.3 SAP dans les cellules NKT

Les cellules NKT sont d'importants effecteurs de la réponse antivirale et antitumorale. Le fait que SAP soit exprimé dans ces cellules constitue un terrain propice à d'éventuelles anomalies de fonction chez les patients XLP. De récents efforts en ce sens démontrent effectivement que les NKT de patients XLP ou de souris SAP^{-/-} sont complètement absents (219, 220). Par ailleurs, une observation de longue date révèle le même type d'anomalie de développement dans les souris Fyn^{-/-}

(221). L'interaction précédemment décrite entre SAP et Fyn pourrait potentiellement expliquer ce défaut. Il faut tout de même considérer que peu de données sont disponibles concernant l'expression des SRR dans les cellules NKT, il est donc possible que le mécanisme contrôlant l'ontogénie SAP dépendante des cellules NKT ne soit pas seulement la résultat de l'interaction SAP-Fyn.

5.3 EAT-2 et ERT : des molécules aux fonctions inconnues

Une partie importante de cette section sera traitée dans le chapitre II et III. EAT-2 a été identifiée comme une protéine induite suite à la transformation de fibroblastes NIH3T3 par la protéine chimérique EWS/FLI1 associée au développement du sarcome d'Ewing (222). Initialement il a donc été proposé qu'EAT-2 puisse jouer un rôle dans l'évolution de ce type de sarcome. La structure d'EAT-2 est très proche de celle de SAP (Figure 5). En effet la cristallisation du domaine SH2 d'EAT-2 montre que la protéine est structurellement superposable à SAP (192). Le domaine SH2 d'EAT-2 permet aussi à la protéine de s'associer à des récepteurs de la famille SLAM, mais contrairement à SAP, la phosphorylation du motif tyrosine est requise pour que cette interaction se produise (192) (et chapitre II). ERT, le dernier membre de la famille possède de nombreuses homologies de séquence avec EAT-2, laissant présager une grande similitude potentielle dans la structure-fonction de ces deux protéines. L'une des différences majeures de séquence entre SAP et EAT-2/ERT est localisée dans la région carboxy-terminale de ces protéines (Figure 5). Cette séquence non cristallisable et sans structure singulière est particulièrement spécifique à chacune de ces protéines leur conférant probablement des fonctions uniques. Toutes ces caractéristiques intrigantes rendaient EAT-2 et ERT très intéressantes surtout dans une perspective de comparaison avec l'adaptateur SAP responsable d'anomalies du système immunitaire dans sa forme mutée. Les chapitres II et III décriront donc les résultats concernant les homologies et les différences concernant les spécificités biochimiques et les fonctions de ces adaptateurs dans le contexte des cellules immunes.

6. Rôle potentiel des récepteurs de la famille SLAM dans les maladies autoimmunes

L'analyse du lupus murin a démontré que l'un des locus de susceptibilité (*Sle1*) est localisé sur le chromosome 1 et inclut les gènes codant pour les récepteurs de la famille SLAM. Ce locus, sous sa forme allélique b (*Sle1b*) provoque une susceptibilité au lupus. Il est à noter que cette forme allélique correspond au fond génétique de souris 129 Sv/J et Balb/c. Les récepteurs de la famille SLAM présentent en fait de nombreux polymorphismes dépendant des fonds génétiques de souris. Il est donc probable que des polymorphismes spécifiques sur l'un ou plusieurs de ces récepteurs puissent induire un changement dans la susceptibilité à certaines maladies autoimmunes. Les dernières études sur ce sujet suggèrent aussi une modification dans les niveaux d'expressions de certains de ces récepteurs (223). L'allèle *Sle1b* provoquerait préférentiellement l'expression de l'isoforme Ly108-1 alors que le locus résistant (C57/BL6) exprimerait plus fréquemment l'isoforme Ly108-2 (224). L'augmentation de Ly108-1 dans les cellules B semblerait ainsi réduire leur activité en réponse à l'activation du BCR. Ce phénomène serait responsable d'un défaut dans l'élimination des cellules B autoréactives durant leur éducation. L'implication des adaptateurs de la famille SAP dans ce contexte demeure inconnue.

7. Problématique et objectifs

Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP), est une immunodéficiência qui survient chez certains garçons après une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (195). Le gène muté responsable de la maladie a été identifié et code pour une protéine nommée SAP (140, 141). Celle-ci est composée d'un unique domaine SH2 (Src homology 2) et d'une courte queue carboxyterminale. SAP est exprimée dans les cellules T et les "natural killer (NK) cells". Différentes études ont démontré une association de SAP avec la région cytoplasmique de récepteurs exprimés dans les cellules immunitaires appartenant à la famille SLAM, tels que SLAM, 2B4, NTB-A, Ly-9, Ly-108, CD84 et CRACC (8). La plupart des effets physiologiques de ces récepteurs ne sont pas connus, par contre, il semble que l'activation de SLAM module la production de cytokines dans les cellules T activées (142). Notre laboratoire a montré que SLAM est capable d'induire la phosphorylation de protéines impliquées dans l'activation des cellules T par un mécanisme strictement dépendant de l'expression de SAP et de sa liaison à SLAM. Dans ce système, SAP facilite le recrutement de la protéine tyrosine kinase FynT, qui phosphoryle le domaine cytoplasmique de SLAM (149). Par ailleurs, de nombreuses évidences selon lesquelles SAP est impliquée dans la régulation du système immunitaire ont été fournies pour l'analyse de souris déficientes pour SAP (161).

Une deuxième protéine nommée EAT-2 a été identifiée, et s'apparente par sa composition et sa structure à SAP (192, 222). De part l'importance de SAP, il apparaissait probable qu'EAT-2 puisse jouer un rôle aussi essentiel dans la régulation des cellules immunes. Au commencement de ce projet peu de données étaient disponibles concernant le patron d'expression et la fonction d'EAT-2. L'objectif du projet s'est donc basé sur plusieurs hypothèses et stratégies.

Objectif 1 : comparaison de la structure-fonction entre SAP et EAT-2, détermination du mécanisme d'action de SAP. Bien qu'il ait été montré que SAP soit capable de recruter FynT, aucune donnée n'a spécifié le mécanisme exact et la

conséquence physiologique qui résulte de cette interaction. Nous avons donc cherché à déterminer par quel moyen SAP était capable de recruter Fyn. Différentes stratégies utilisant des méthodes de biochimie nous ont permis d'identifier un motif unique dans SAP qui permet son association avec FynT. Parallèlement, la grande similarité qu'il existe entre SAP et EAT-2 laissait penser que les deux protéines pouvaient avoir des fonctions proches dans les voies de signalisation des cellules immunes. Tout en analysant cette interaction (SAP-FynT), il nous est apparu qu'il existait en fait de grandes différences entre EAT-2 et SAP, en particulier concernant leur mode d'action dans la signalisation. Cette constatation nous a conduite à définir le deuxième objectif.

Objectif 2 : Identification de la fonction et mode d'action EAT-2 dans les cellules immunes. Afin de déterminer la fonction d'EAT-2 nous avons testé plusieurs hypothèses en se basant sur les connaissances acquises par SAP. Nous avons ainsi testé la possible association d'EAT-2 avec les récepteurs de la famille SLAM, et son éventuelle implication dans la transduction d'un signal intracellulaire. Par ailleurs, Il paraissait aussi essentiel de déterminer le patron d'expression d'EAT-2 dans les cellules immunitaires primaires (chez la souris). Afin de déterminer la fonction d'EAT-2 *in vivo*, nous avons opté pour une approche de délétion de la protéine (KO) dans la souris. Cette stratégie a permis de révéler les différences de fonctions entre EAT-2 et SAP et a mis à jour l'importance d'EAT-2 dans la régulation de cellules immunes et en particulier des cellules NK.

CHAPITRE II

Comparaison dans la structure et la signalisation SAP/EAT-2

Introduction: Ce chapitre n'est pas un article à part entière, il vient en complément de l'article présenté en annexe (Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. Nat Cell Biol. 2003 Feb;5(2):149-54.) afin d'y apporter des précisions et des nouvelles données qui permettent d'introduire et d'intégrer l'article présenté dans le chapitre III. Les matériels et méthodes s'y rapportant sont décrits dans l'article mentionné ci-dessus.

1. INTRODUCTION

Les adaptateurs de la famille SAP comprennent trois membres connus chez la souris: SAP, EAT-2 et ERT. Ces molécules sont composées d'un domaine SH2 et d'une courte queue carboxyterminale. SAP est exprimé dans les cellules NK et les cellules T, EAT-2 est exprimé dans les cellules dendritiques et les cellules NK et ERT est exclusivement exprimé dans les cellules NK. Cette famille d'adaptateurs est devenue particulièrement intéressante suite à la découverte de mutations dans le gène qui code pour SAP. Ces mutations qui provoquent une perte de fonction ou d'expression de la molécule SAP conduit au syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP) qui se caractérise par l'incapacité à contrôler l'infection au virus de l'Epstein Bar (EBV). Cette observation implique que SAP et peut-être EAT-2/ERT sont des composants importants des voies de signalisation impliquées dans la régulation des réponses immunes.

De précédentes études ont démontré que SAP est capable de s'associer aux récepteurs de la famille SLAM (SRR). L'une des mieux caractérisée concerne l'association SLAM-SAP dans les cellules T. SAP s'associe de manière constitutive, par son domaine SH2, à la première tyrosine située dans le domaine intracytoplasmique de SLAM. Cette association est unique puisqu'elle survient de façon phospho-indépendante. L'interaction entre SAP et SLAM provoque le recrutement de la Src kinase FynT au complexe, ce qui induit un signal intracellulaire caractérisé par la phosphorylation et l'activation des protéines SHIP, Dok-1 et Dok-2. Cette voie de signalisation semble conduire à une diminution de la production de l'IFN- γ dans les cellules T. Il faut de tout de même noté que malgré les bonnes connaissances qui entourent cette voie de signalisation, le mécanisme de recrutement de FynT au complexe SLAM-SAP demeure inconnu.

Peu d'études ont à ce jour caractérisé EAT-2/ERT et leur éventuelle implication dans une voie de signalisation. Bien que ces deux molécules aient de grandes similarités par rapport à SAP, il est possible qu'elles possèdent des

fonctionnalités particulières associées aux spécificités de leurs séquences en acides aminés.

Afin de répondre à certaines de ces questions, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires qui régissent les associations entre les adaptateurs de la famille SAP et les SRR, ainsi que les effecteurs associés à ces voies de signalisation. Nos résultats montrent que SAP, à la différence d'EAT-2, est capable de recruter la Src kinase FynT par un mécanisme unique qui implique le domaine SH3 de FynT et le domaine SH2 de SAP. Par ailleurs, EAT-2 semble capable en s'associant aux récepteurs de la famille SLAM d'induire un signal intracellulaire dépendant des Src kinases qui provoque la phosphorylation de plusieurs effecteurs intracellulaires incluant, SHIP, Dok-1, Dok-2 et c-Cbl. Cette voie de signalisation pourrait définir une spécificité de fonction à EAT-2 dans les cellules immunes.

2. SAP et EAT-2 s'associent aux SRR et induisent un signal intracellulaire spécifique

Afin de déterminer si EAT-2 est capable de s'associer aux récepteurs de la famille SLAM, nous avons utilisé le système d'une lignée cellulaire T (BI-141) qui n'exprime ni de SRR ni d'adaptateurs de la famille SAP. L'analyse de la phosphorylation intracellulaire après transfection avec SLAM uniquement ou SLAM-SAP (SS), SLAM-EAT-2 (SE) indique que ces adaptateurs, en présence de SLAM, sont capables d'induire un signal intracellulaire distinct (Fig 1a). Le même type de phénomène est observé avec ERT mais dans une moindre mesure (Fig 1b). SLAM étant exprimé abondamment après transfection, l'interaction homotypique cellules à cellules résultante est suffisante pour induire un signal sans stimulation particulière. Comme précédemment observé, l'expression de SLAM seul ne suffit pas à induire un signal intracellulaire (149). L'addition de SAP dans ce système induit la phosphorylation de SLAM lui-même et d'effecteurs secondaires tels que SHIP, Dok1 et Dok2 (149)(et Fig 1a). De manière similaire l'addition d'EAT-2 en présence de SLAM induit la phosphorylation des mêmes effecteurs. Néanmoins, on note

l'apparition d'un substrat supplémentaire identifié comme étant c-Cbl, une ubiquitine ligase (Fig 1c). La phosphorylation de c-Cbl est spécifique à EAT-2 et ne s'observe pas dans le signal médié par ERT (Fig 1b).

Afin de déterminer dans quelle mesure les adaptateurs de la famille SAP sont capables de s'associer à SLAM, nous avons co-immunoprécipité le récepteur et les adaptateurs dans le système des BI-141. Ces expériences révèlent qu'aussi bien SAP qu'EAT-2 sont capables de s'associer au récepteur SLAM (Fig 2a). Dans ce système le signal d'engagement étant constitutif, il est difficile de déterminer si EAT-2, à la manière de SAP, peut aussi s'associer de façon phospho-indépendante au récepteur SLAM. Pour résoudre cette question, nous avons utilisé une chimère Tac-SLAM dont la partie extracellulaire et transmembranaire ont été remplacées par celles de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Tac). L'utilisation de cette chimère permet d'obtenir un signal inductible grâce à l'utilisation d'anticorps anti-Tac (149). Comme observé précédemment, la stimulation du récepteur en présence de SAP induit la tyrosine phosphorylation de Tac-SLAM (149)(et Fig 2b lignes 3 et 4). De manière similaire, l'addition d'EAT-2 dans les cellules exprimant Tac-SLAM après stimulation provoque la phosphorylation du récepteur (Fig 2b lignes 5 et 6). Par ailleurs, l'immunoprécipitation du récepteur confirme que SAP s'associe constitutivement à Tac-SLAM. De manière intéressante, la même expérience avec EAT-2 démontre que l'adaptateur ne s'associe au récepteur qu'après stimulation de celui-ci. Par opposition à SAP, EAT-2 s'associe donc de manière phospho-dépendante à SLAM.

3. Le signal induit par SAP et EAT-2 via SLAM est dépendant des Src kinases

Afin de tester la possible implication des Src kinases dans les signaux promues par SAP et EAT-2, nous avons traité les cellules BI-141 SS ou SE avec des doses croissantes de PP2, un inhibiteur chimique des Src kinases, ou son analogue inactif le PP3. Dans les deux situations, l'ajout de PP2 inhibe dramatiquement le signal de tyrosine phosphorylation induit par les complexes SS ou SE (Fig 3a). En

comparaison le PP3 n'a pas d'effet. De manière similaire, la co-transfection dans les BI-141 d'un mutant constitutivement actif de Csk (Src-Csk), une protéine tyrosine kinase responsable de l'inactivation de Src kinases (109), réduit considérablement le signal de tyrosine phosphorylation (Fig 3b). On note cependant que la tyrosine phosphorylation de SLAM est moins affectée dans le cas de SAP que dans le cas d'EAT-2 (Fig 3b ligne 4 vs 6). Ceci s'explique probablement par la capacité de SAP à s'associer constitutivement à SLAM, et donc probablement à protéger le récepteur de l'action de tyrosines phosphatases. Ces deux résultats confirment d'une part pour SAP (149) et démontrent d'autre part pour EAT-2, le rôle central joué par les Src kinases dans l'initiation et la maintenance du signal induit par les complexes SS et SE.

4. Spécificité de SAP dans le recrutement de Fyn

SAP est capable de recruter la Src tyrosine kinase Fyn (149). Étant donné que les signalisations de SLAM via SAP et EAT-2 sont toutes deux dépendantes des Src kinases, il semble probable qu'EAT-2 puisse aussi recruter cette kinase. Afin de tester cette hypothèse, nous avons co-immunoprécipité les complexes SS ou SE et identifier une éventuelle association avec Fyn. Comme espéré Fyn est associée au complexe SS (Fig 4a ligne 3). Par opposition, le complexe SE ne semble pas être capable de recruter Fyn de manière stable (Fig 4a ligne 5). Cette expérience permet donc de constater la spécificité du complexe SS à recruter Fyn. Par ailleurs, il faut noter que cette association est strictement dépendante de la présence de SAP : SLAM seul ne permet pas ce recrutement (Fig 4a ligne 1).

Au vu de ces observations il semble important de déterminer si l'association de Fyn survient sur le récepteur ou sur SAP. Des expériences utilisant soit le domaine SH2 soit le domaine SH3 de Fyn démontrent, contre toute attente, une meilleure capacité du domaine SH3 de Fyn à interagir avec le complexe, mais seulement en présence de SAP (150). Dans ce contexte il semblait plausible que le domaine SH3 de Fyn puisse directement s'associer à SAP. L'habilité de peptides GST-Fyn-SH3 à

s'associer à SAP *in vitro* confirme cette hypothèse (Fig 4b). On constate que cette association est hautement spécifique, ainsi aucun autres domaines SH3 de Src kinases ne possèdent la capacité d'interagir avec SAP (Fig 4c). Cette spécificité entre SAP et Fyn est aussi conservée chez la protéine SAP humaine (Fig 4e). Contrairement à SAP, EAT-2 n'est pas capable de s'associer au domaine SH3 de Fyn (Fig 4b), ni même à aucun autres domaines SH3 de Src kinases (Fig 4d). Ces expériences permettent ainsi de démontrer une différence majeure entre les deux adaptateurs SAP et EAT-2.

5. L'arginine R78 dans le domaine SH2 de SAP est requis pour l'interaction avec Fyn

SAP est constituée d'un domaine SH2 et d'une courte queue carboxy-terminale. Afin de déterminer quelle région de SAP est responsable de l'association de la molécule au domaine SH3 de Fyn, nous avons créé une série de chimères SAP-EAT-2. Comme cité ci-dessus, EAT-2 est incapable d'interagir avec le domaine SH3 de Fyn. L'utilisation de ces chimères dont des longueurs progressives de régions appartenant à EAT-2 ou SAP sont échangées, permettront d'identifier la section peptidique de SAP responsable de l'association à Fyn (Fig 5a). Les premières expériences montrent que la région d'interaction se situe dans la partie carboxy-terminale de SAP. Ainsi, seule la chimère EAT-2-SAP#1 s'associe au domaine SH3 de Fyn et non la chimère SAP-EAT-2 (Fig 5b). Le remplacement progressif de la partie codante de SAP par la séquence d'EAT-2 permet de déterminer une région de SAP entre les acides aminés 67 et 92 responsables de l'association au domaine SH3 de Fyn (Fig 5a et 5c). Afin de mieux délimiter la région essentielle à cette interaction, nous avons réalisé une mutagenèse systématique des acides aminés situés dans la région 67-92 en alanine. Les résultats montrent qu'il existe un motif essentiel centré sur l'arginine R78 responsable de l'association SAP-Fyn (Fig 5d et résultats non montrés). De plus amples études, en particulier par l'utilisation de BI-141 transfectées avec le mutant SAP^{R78A} confirment ces observations et permettent de déterminer le motif RFFR⁷⁸KVKN et plus généralement RFFRxVKN (R pour arginine, F pour phénylalanine, V pour valine, K pour lysine, N pour asparagine et x pour un acide aminé quelconque) comme requis pour l'interaction de SAP avec le domaine SH3 de FynT (Fig 5e) (150). En analysant la structure tridimensionnelle de SAP, on constate que ce motif est localisé dans le domaine SH2 de SAP et plus particulièrement entre le sixième feuillet β ($F\beta$) et la seconde hélice α ($\alpha 2$) (Fig 6a).

7. Discussion

SAP, EAT-2 et ERT sont tous exprimés dans les cellules hématopoïétiques. La grande similarité de séquence entre ces protéines suggère qu'elles possèdent des capacités signalitiques et structurelles communes. Cette étude apporte des précisions sur les différences mais aussi les ressemblances qui caractérisent les différents membres de la famille SAP. Ainsi, on note que tous ces adaptateurs sont capables de s'associer au récepteur SLAM et plus généralement aux récepteurs de la famille SLAM (pour ERT résultats non montrés). Cette association révèle pourtant une différence majeure entre SAP et EAT-2/ERT. En effet à la différence de SAP, il semble qu'EAT-2 s'associe de façon phospho-dépendante au récepteur et ceci seulement après l'engagement du récepteur. Ce résultat avait déjà été remarqué par des transfections dans des systèmes hétérologues (192). Néanmoins, il semblait important de s'assurer de ce type d'interaction dans les conditions physiologiques des cellules hématopoïétiques. Par ailleurs, nos résultats montrent clairement et pour la première fois qu'EAT-2 est aussi capable d'engendrer un signal intracellulaire via le récepteur SLAM. La nature de ce signal est en partie différente de celui induit par SAP. Ainsi, SHIP, Dok-1 et Dok-2 sont activés et phosphorylés suite à l'activation du complexe SE, mais on note aussi une augmentation très significative de la phosphorylation de c-Cbl, une E3 ubiquitine ligase. c-Cbl est essentiellement impliquée dans l'internalisation de récepteurs membranaires et en particulier du complexe TCR et des molécules associées dans les cellules T. Par ailleurs, c-Cbl peut aussi réguler les tyrosines kinases proximales impliquées dans la signalisation du TCR. Ainsi, c-Cbl est capable d'inhiber ZAP-70 et Lck, l'un en modulant son activité (123, 225), l'autre en induisant sa dégradation (226). L'observation de l'activation de c-Cbl induit par le complexe SE pourrait donc conduire à ce type de signal. L'une des questions concernant cette observation est la manière par laquelle EAT-2 est capable d'activer c-Cbl. L'analyse de la queue carboxy-terminale d'EAT-2 révèle qu'une tyrosine (la tyrosine Y120) possède une séquence d'association probable à Grb2

(227). Plusieurs études ont montré une association entre le domaine SH3 de Grb2 et une région riche en prolines dans c-Cbl (121, 228). Dans ce contexte il est possible qu'EAT-2 induise la phosphorylation de c-Cbl grâce au recrutement de Grb2. Quelles peuvent les conséquences de l'activation de c-Cbl ? Comme mentionné précédemment, il est possible que c-Cbl agisse comme un inhibiteur, et induise donc l'inactivation de la voie de signalisation du TCR. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de co-stimuler la voie SLAM-EAT-2 et la voie TCR afin d'en déterminer les effets. Un tel phénomène d'inhibition impliquerait EAT-2 dans la régulation proximale du TCR. Une autre possibilité concernant cette activation pourrait être avancée. Il est en effet possible que l'activation de c-Cbl soit une résultante normale de la stimulation du récepteur SLAM, permettant son internalisation après son engagement. Dans ce cas, il est donc étonnant que l'association de SAP avec SLAM n'induisse pas le même type de signal. L'une des composantes importantes à considérer est évidemment que SAP est constitutivement associé à SLAM, et que donc un tel signal pourrait provoquer une internalisation chronique incompatible avec la signalisation normale SAP-SLAM. La différence du fonctionnement de l'association du domaine SH2 d'EAT-2 à SLAM pourrait donc permettre cette spécificité à EAT-2, et donc l'impliquer dans le mécanisme d'internalisation des récepteurs de la famille SLAM. Des résultats préliminaires montrent qu'il est en effet possible qu'EAT-2 soit capable de moduler l'expression de certains récepteurs (résultats non montrés), mais la signification physiologique de ce phénomène demeure à prouver.

Le mécanisme par lequel SAP et EAT-2 engendrent le signal intracellulaire est aussi particulièrement spécifique à chacun de ces adaptateurs. En effet, bien que le signal induit par les deux adaptateurs soit dépendant des Src kinases, nos résultats montrent qu'il existe une différence essentielle dans le recrutement et l'activation des kinases. Dans le cas de SAP, on observe une association inductible et persistante avec la Src kinase Fyn au complexe SS. EAT-2 pour sa part, ne semble pas pouvoir interagir de manière stable avec Fyn. Néanmoins, l'activation des Src kinases restent nécessaire et requise pour induire le signal dépendant d'EAT-2. L'étude subséquence

(Chapitre III) donnera des pistes sur le mécanisme d'action d'EAT-2 et je discuterai de ce point dans le dernier chapitre (Discussion générale). Une des particularités de SAP réside dans sa spécificité à recruter directement le domaine SH3 de Fyn. Il est intéressant de noter que seul le domaine SH3 de Fyn dispose de cette spécificité et qu'aucun autre domaine SH3 de Src kinase ne possède cette capacité. L'analyse tridimensionnelle par cristallographie du complexe Fyn-SH3/SAP (229) dévoile que seuls quelques acides aminés du domaine SH3 de Fyn sont requis pour l'interaction avec SAP (Fig 6a et b). On note ainsi que l'acide aspartique D¹⁰⁰ et le tryptophane W¹¹⁹ de Fyn sont impliqués dans un double pont hydrogène avec l'arginine R⁷⁸ de SAP. L'alignement des domaines SH3 des Src kinases montre pourtant une grande similarité de séquence (Fig 6b). Ainsi les kinases Yrk et dans une moindre mesure Fgr et Src possèdent soit une identité, soit une grande homologie par rapport à Fyn concernant les acides aminés impliqués dans l'interaction. La seule identité dans ces acides aminés n'est donc probablement pas suffisante pour expliquer la spécificité du domaine SH3 de Fyn. Il est en fait concevable que la structure tridimensionnelle générée par les acides aminés non impliqués directement dans l'interaction confère une particularité unique au domaine SH3 de Fyn. L'autre face de cette interaction concerne bien évidemment le domaine SH2 de SAP. Habituellement les domaines SH3 sont reconnus par des régions riches en prolines. De telles séquences ne sont pas réellement présentes chez SAP, il semblait donc improbable que SAP puisse interagir avec un domaine SH3. La découverte du motif RFFR⁷⁸KVKN dans son domaine SH2 confère à SAP une double capacité d'interaction dans une même région. Ainsi, la partie C terminale du domaine SH2 possédant le motif RFFR⁷⁸KVKN est localisée en dehors de la poche d'interaction caractérisée par le feuillet D (β D) qui est responsable de l'association au motif tyrosine de SLAM. Cette observation permet de dégager deux concepts particulièrement importants. Le premier concerne l'activation des Src kinases. Il a déjà été montré que l'engagement du domaine SH3 des Src kinases était un moyen efficace pour induire l'activation de ces kinases (154). On peut ainsi citer comme exemple la protéine Nef du VIH qui en s'associant au domaine SH3 de Hck active la kinase (230, 231). Nos résultats confirment ce mécanisme et ceci dans une

situation physiologique normale, démontrant par là même les multiples manières des Src kinases à s'activer. L'autre concept émergeant concerne les caractéristiques d'interaction des domaines SH2 et SH3. En effet, nos observations montrent qu'il est tout à fait possible que des associations inusuelles peuvent survenir entre certaines molécules, les rendant très spécifiques et par là même cruciales pour la signalisation intracellulaire. On note d'autres exemples d'interactions s'abrogeant des règles classiques d'interaction des domaines SH2 (association avec des pY) et SH3 (association avec des régions riches en prolines). Déjà en 1996, Anafi et collègues suggèrent que le domaine SH2 de Crk, après une modification de la structure induit par la phosphorylation de la tyrosine Y²²¹, devient capable de s'associer à des domaines SH3 (232). Il est à noter que cette association est toujours proline dépendante. Plus récemment, une autre étude a montré qu'un domaine SH3 pouvait s'associer en l'absence d'une région riche en prolines. Ainsi le domaine SH3 de Gads reconnaît un motif de type RxxK (R pour arginine, K pour lysine, et x pour un acide aminé quelconque) sur l'adaptateur SLP-76 (151). Ce type d'association est nettement plus stable que l'interaction classique du domaine SH3. De plus, elle induit une réorganisation structurale de SLP-76 qui pourrait être importante pour l'assemblage au complexe formé avec LAT.

En conclusion, ces résultats démontrent une grande spécificité pour chacun des adaptateurs de la famille SAP. En effet, bien que leur structure et leur séquence soient apparentées, chacun de ces adaptateurs est capable d'induire un signal distinct, et ceci, en s'associant d'une manière différente aux SRR, mais aussi en recrutant les effecteurs de façon caractéristique.

7. Légendes des figures

Figure 1 : Régulation de la signalisation de SLAM par SAP et EAT-2. *a.* Impact d'EAT-2 et de SAP sur la signalisation phosphodépendante de SLAM dans les cellules T. Lysats ou immunoprécipitations de cellules T BI-141 exprimant de manière stable les polypeptides indiqués. La phosphorylation de SLAM a été vérifiée par immunoprécipitation du récepteur et révélé par un anti-phosphotyrosine (4G10). *b.* Impact d'ERT et comparaison avec EAT-2 sur la signalisation phosphodépendante de SLAM dans les cellules T. L'expression d'ERT est vérifiée avec un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant EAT-2 et ERT. *c.* Tyrosine phosphorylation de c-Cbl et SHIP dans les cellules BI-141 exprimant SLAM (ligne 1) ou SLAM et EAT-2 (ligne 2).

Figure 2 : Association de SAP ou EAT-2 à SLAM. *a.* Immunoprécipitation de SLAM et révélation des adaptateurs de la famille SAP par des anticorps spécifiques pour SAP ou EAT-2 dans les cellules T BI-141. Le niveau d'expression de chacun des adaptateurs est vérifié par lysat total. *b.* BI-141 exprimant Tac-SLAM en présence (lignes 3, 4, 5 et 6) ou en l'absence (lignes 1 et 2) des adaptateurs de la famille SAP ont été stimulées (+) ou non (-) par un anticorps anti-Tac biotinylé avec de l'avidine pendant 5 mn à 37°C. L'association de SAP ou EAT-2 à Tac-SLAM a été vérifiée par immunoprécipitation du récepteur et révélation par des anticorps spécifiques à chacun des adaptateurs.

Figure 3 : Implication des Src kinases dans la signalisation SLAM-SAP et SLAM-EAT-2. *a.* Analyse de la tyrosine phosphorylation de lysats de cellules T BI-141 exprimant SS ou SE ayant été traités pendant 16H avec des doses croissances de PP2 ou de PP3. *b.* Analyse de la tyrosine phosphorylation de lysats de cellules T BI-141 exprimant SLAM, SS ou SE en présence (+) ou en l'absence (-) de Src-Csk

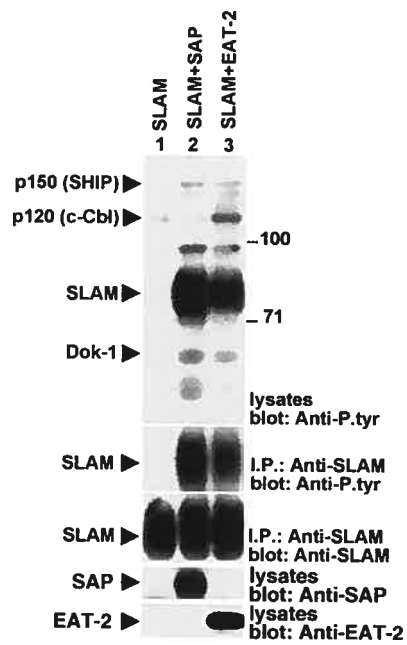
(polypeptide rétroinfecté). L'expression de Src-Csk est détectée par un anticorps anti-Src.

Figure 4 : Analyse de l'interaction entre FynT et les adaptateurs de la famille SAP. *a.* Association de FynT au complexe SLAM dans les cellules T BI-141. Les récepteurs SLAM ou CD4 (contrôle) ont été immunoprécipité à partir de lysats de cellules T BI-141 exprimant SLAM (lignes 1 et 2), SS (lignes 3 et 4) ou SE (lignes 5 et 6). L'immunoprécipitation est révélée par un anticorps anti-FynT. *b,c,d.* Association GST. Lysats de cellules Hela transfectées avec le vecteur contrôle ou SAP ou EAT-2 mis en présence de billes GST ou de différents domaines SH3 de Src kinases couplés à GST. *e.* Association du domaine SH3 de Fyn au polypeptide SAP humain dans les mêmes conditions que *b,c,d.*

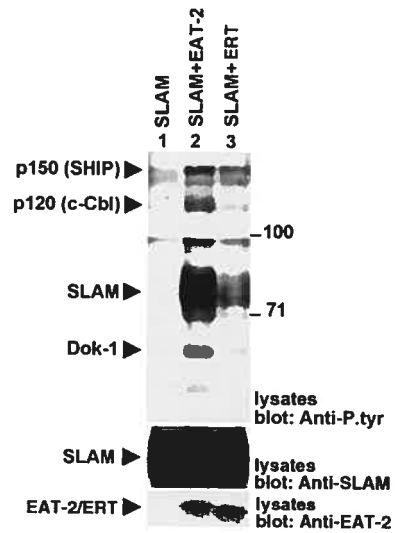
Figure 5 : L'arginine R78 de SAP est responsable de l'association à FynT. *a.* Schéma représentant les différentes chimères SAP/EAT-2 et leur capacité d'association au domaine SH3 de FynT. *b,c,d.* Capacité des différentes chimères et mutants de SAP à interagir dans des expériences de GST associations. *e.* Analyse de l'association de GST ou de GST-Fyn-SH3 à SAP ou à SAP^{R78A} exprimé de manière stable dans les cellules T BI-141.

Figure 6 : Structure tridimensionnelle et association du complexe SLAM-SAP-FynT SH3. *a.* Représentation tridimensionnelle du complexe SLAM-SAP associé au domaine SH3 de FynT. *a et b.* L'arginine R78 dans SAP et l'asparagine D100 et le tryptophane W119 dans le domaine SH3 de Fyn sont impliqués dans l'interaction. Le sur-lignage vert dans l'alignement de domaines SH3 signale les acides aminés impliqués dans l'interaction avec SAP.

a.



b.



c.

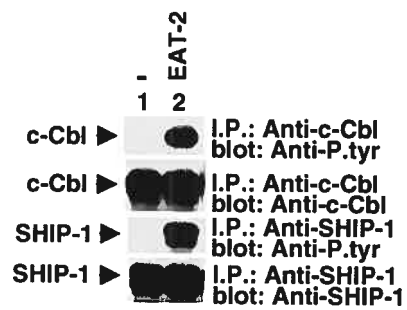


Figure 1

a.



b.

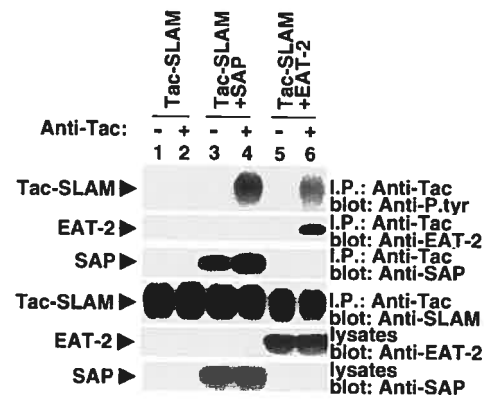


Figure 2

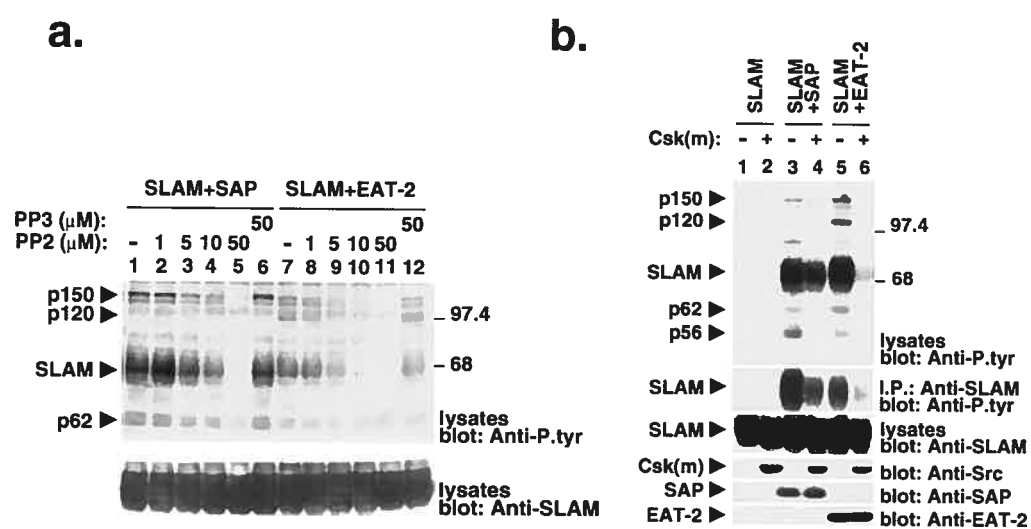


Figure 3

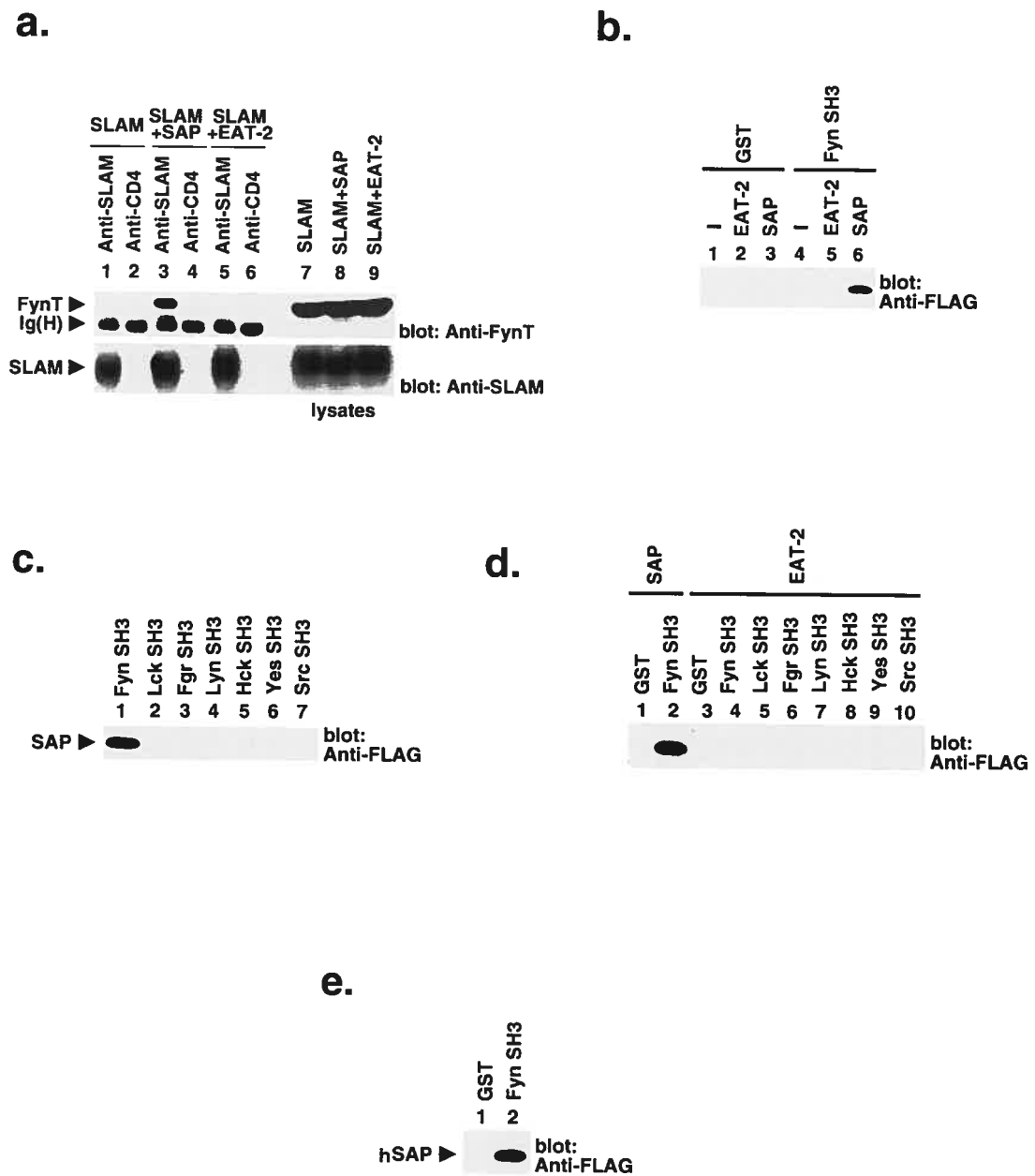


Figure 4

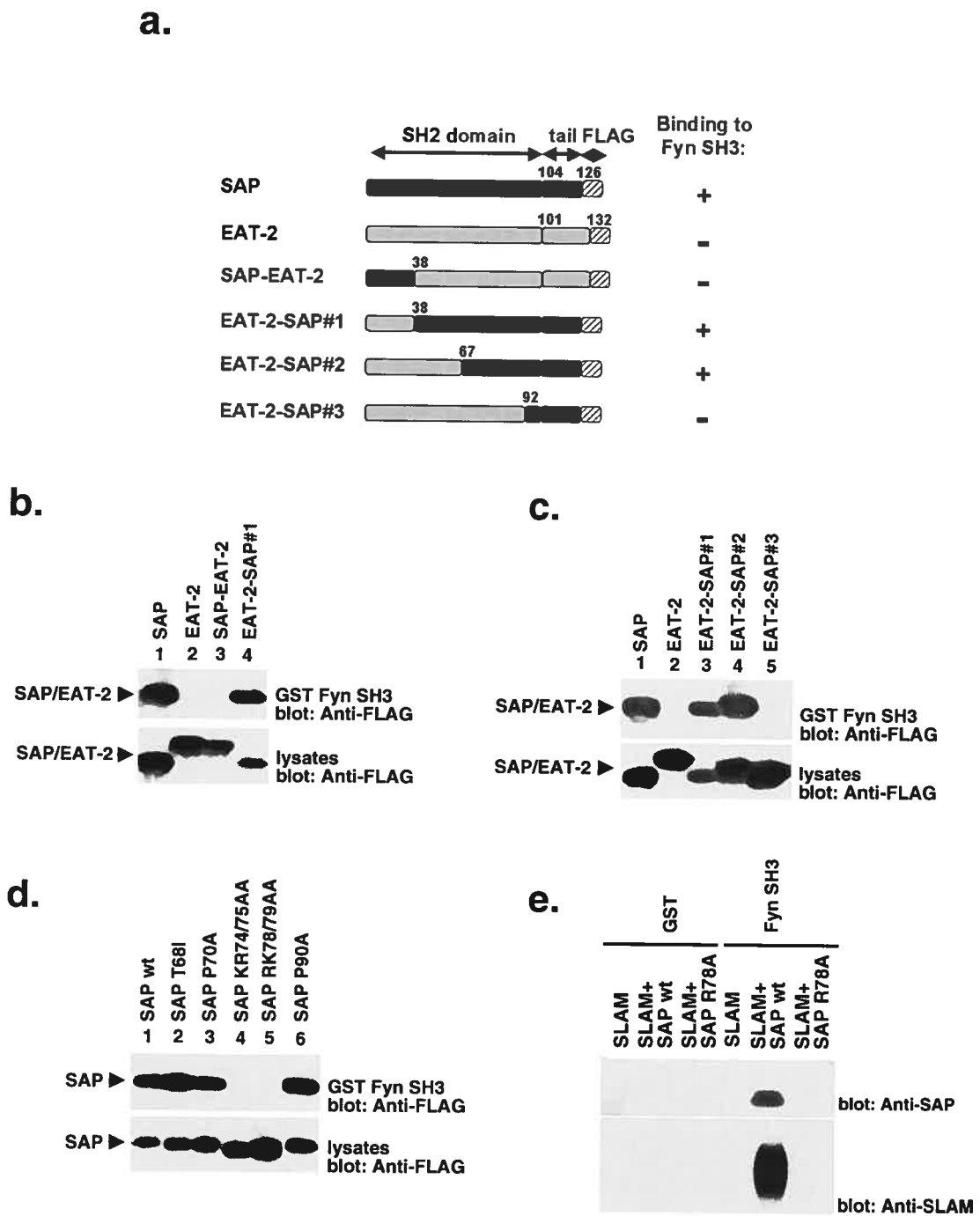


Figure 5

a.

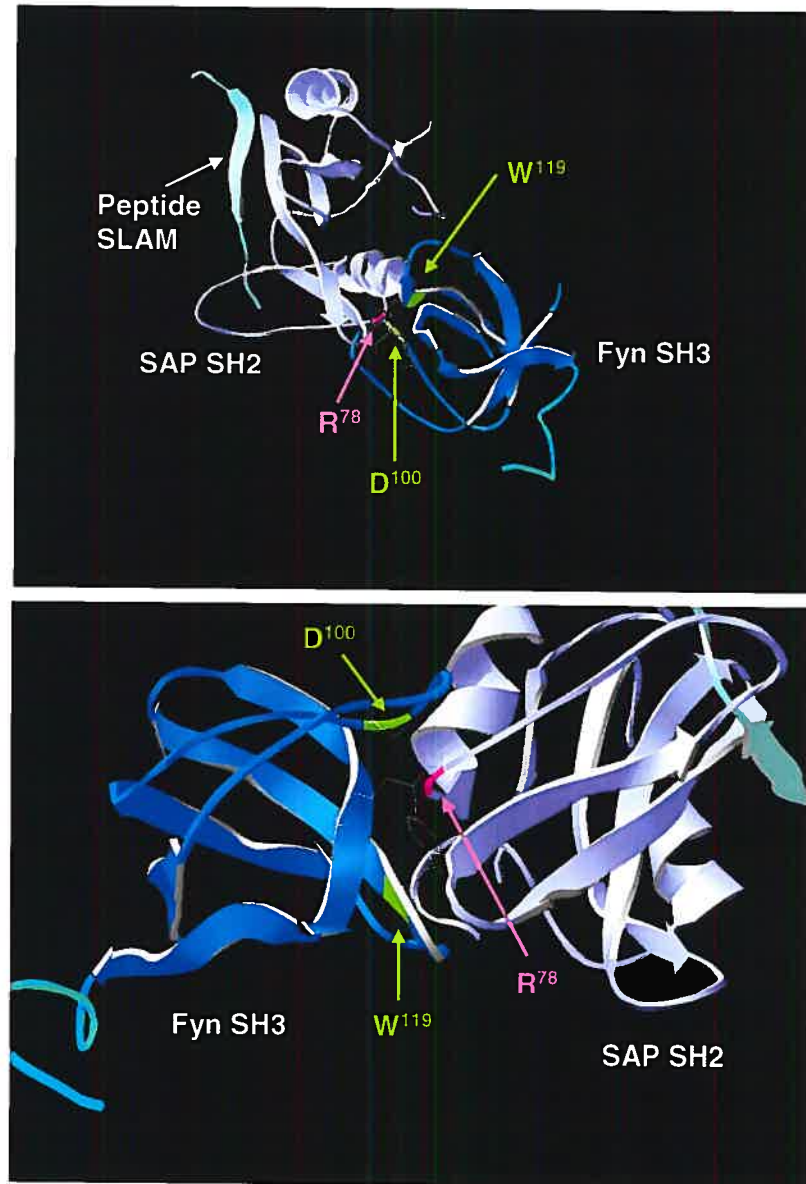
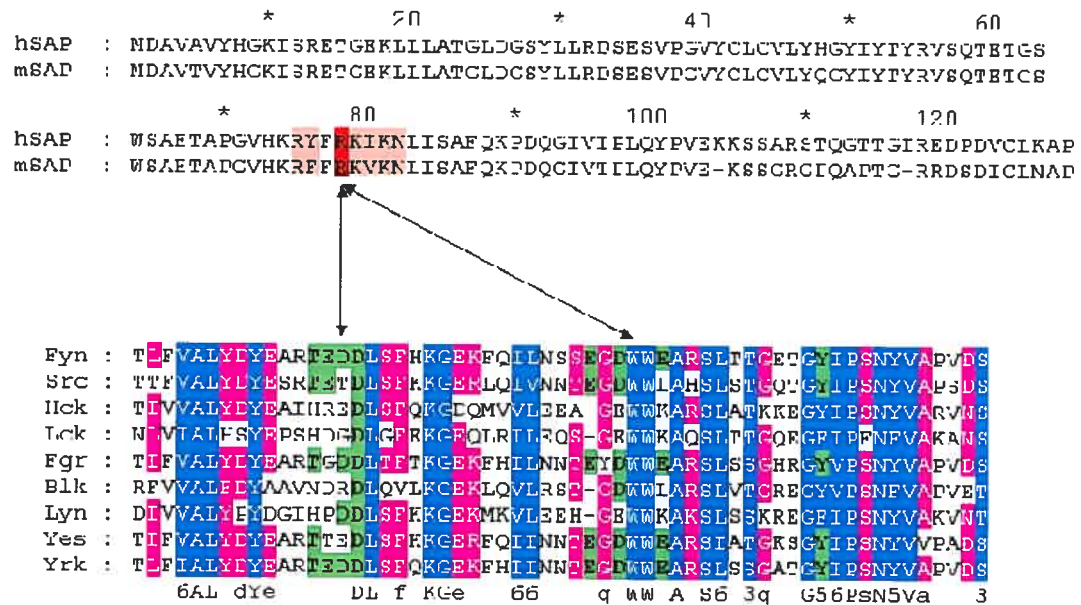


Figure 6

b.



Domaine SH3

Figure 6

CHAPITRE III

Negative regulation of NK cell functions by EAT-2, a SAP-related adaptor

Romain Roncagalli, James E.R. Taylor, Shaohua Zhang, Xiaochu Shi, Riyan Chen, Mario-Ernesto Cruz-Munoz, Luo Yin, Sylvain Latour and André Veillette

Nature Immunology. 2005 Oct;6(10):1002-10.

Contribution des auteurs

Taylor JE : Clonage du l'ADNc de ERT, réalisation de la figure 1C

Zhang S : Transfection et sélection des cellules ES pour les souris déficientes EAT-2 et ERT.

Shi X : Identification des clones positifs sur les ES déficientes pour EAT-2 et ERT. Maintenance de la lignée EAT-2 déficiente.

Chen R : Génération des anticorps anti-2B4 et anti-CD84

Cruz-Munoz ME : Génération de l'anticorps anti-CRACC

Yin L : Nous a fourni les souris déficientes pour SAP

Latour S : Réalisation de la figure 3E et collaboration

Veillette A : Écriture du manuscrit, direction et supervision

Roncagalli R : Identification d'ERT. Constructions moléculaires pour les souris déficientes et transgéniques. Réalisation des Figures 1AB, 2, 3ABCD, 4, 5, 6, 7, 8, 9, S1, S2, S3, S4. Mise au point des PCRs pour l'identification de souris déficientes. Maintenance des lignées. Génération des anticorps anti-EAT-2 et anti-ERT. Écriture du manuscrit.

ABSTRACT

EAT-2 is an adaptor expressed in innate immune cells including NK cells. It is closely related to SAP, which regulates SLAM-related receptors by recruiting FynT to the receptors. Herein, we studied the role of EAT-2 in NK cells by creating mice lacking or overexpressing EAT-2. Similar to SAP, EAT-2 was associated with SLAM-related receptor 2B4 in NK cells. However, unlike SAP, EAT-2 was an inhibitor of NK functions. It repressed natural cytotoxicity and interferon- γ secretion by a mechanism involving tyrosine phosphorylation of its tail. A similar function was demonstrated for ERT, a novel SAP family member expressed in mouse NK cells. These data identify a new mechanism of NK inhibition. Moreover, they indicate that EAT-2 and SAP have distinct and, at times, opposing roles in natural immunity.

Natural killer (NK) cells are part of the first line of defense against pathogens and cancer cells¹⁻³. They express several types of stimulatory and inhibitory monomorphic receptors that recognize ligands on potential target cells. The stimulatory receptors include NKG2D, stimulatory Ly49s and CD16, which are associated with subunits that carry “immunoreceptor tyrosine-based activation motifs” (ITAMs). In contrast, the inhibitory receptors include inhibitory Ly49s and KIRs, which recognize self-class I major histocompatibility complex (MHC) molecules on target cells and contain “immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs” (ITIMs). The balance between the signals delivered by these receptors determines in large part whether or not an NK cell will destroy a target cell.

Other types of receptors also control NK cell activity. Amongst these is 2B4 (CD244), a signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-related receptor abundantly expressed in NK cells⁴⁻⁸. By way of its extracellular domain, 2B4 interacts with CD48, a receptor broadly expressed in immune cells including NK cells^{9,10}. Several studies suggested that 2B4 engagement by CD48 stimulates the ability of NK cells to kill target cells and produce inflammatory cytokines such as interferon (IFN)- γ ^{6,7,11}. However, analyses of 2B4-deficient mice indicated that 2B4 can also be an inhibitory receptor^{12,13}. While the precise molecular basis of these two effects is not clarified, one possibility is that 2B4 can be coupled to different intracellular signals that dictate whether 2B4 is stimulatory or inhibitory.

Through sites of tyrosine phosphorylation in its cytoplasmic domain, 2B4 associates with SAP (also named SH2D1A), an adaptor molecule composed of an

SH2 domain and a short C-terminal tail^{7,14,15}. SAP is expressed in NK cells, T cells, NKT cells and some B cells, and is mutated in X-linked lymphoproliferative (XLP) disease in humans. Studies of NK cells from XLP patients demonstrated that SAP is necessary for 2B4 to trigger NK cell-mediated killing and IFN- γ production¹⁶⁻¹⁹. A similar function was recently documented using SAP-deficient mice²⁰. This activity correlates with the capacity of SAP to bind the Src-related kinase (PTK) FynT, via a second binding surface around arginine 78 in the SAP SH2 domain^{20,21}. On the basis of these findings, it is believed that the stimulatory function of 2B4 is dependent on coupling of 2B4 to SAP-FynT-dependent signals.

EAT-2 (also named SH2D1B) is a second member of the SAP family²². Although little is known of this molecule, EAT-2 also interacts with SLAM-related receptors including 2B4, at least in overexpression systems such as yeast or Cos-1 cells²³. However, EAT-2 does not share with SAP the binding site for FynT. Consequently, it may possess an as yet unidentified signaling mechanism linking SLAM-related receptors to other downstream signals.

Here, we examined the role of EAT-2, as well as of a closely related adaptor termed ERT, in NK cells. We found that, similar to SAP, EAT-2 and ERT were associated with 2B4 in NK cells. However, unlike SAP, EAT-2 and ERT were negative regulators of NK functions. They repressed natural cytotoxicity towards certain targets, as well as the capacity of several stimulatory NK receptors to trigger cytokine production. This activity was mediated by tyrosine phosphorylation in the tail of EAT-2 and, presumably, ERT.

RESULTS

ERT, a novel SAP-related adaptor

During sequence analysis of the mouse *Sh2d1b* (*eat-2*) gene using public databases, we discovered a mouse cDNA sequence (accession number BB617320) that may encode a third member of the SAP family (**Fig. 1a**; data not shown). The polypeptide translated from this cDNA, named ERT (for EAT-2-related transducer), is closely related to EAT-2 (82% amino-acid identity). This homology extends to the SH2 domain and the C-terminal region. ERT is less similar to SAP (36% amino-acid identity), particularly in the C-terminal domain. Examination of the mouse genomic database showed that the gene encoding ERT (named *Sh2d1c*) is located 26 kilobases (kb) away from *Sh2d1b* on chromosome 1 (**Fig. 1b**). Since *Sh2d1c* exhibits the same exon-intron structure as *Sh2d1b* and *Sh2d1a*, it represents a third member of the SAP family.

To determine the expression pattern of EAT-2 and ERT, RNA was isolated from mouse immune cells, and transcript levels were determined by reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reactions (PCRs) (**Fig. 1c**). EAT-2 RNA (first panel) was detectable in NK cells (lanes 4 and 11), macrophages (lane 6) and dendritic cells (DCs) (lane 13). However, it was not found in thymocytes (lane 1), splenic T cells (lane 2), mast cells (lane 5) and B cells (lanes 3 and 12). ERT RNA (second panel) was detected only in NK cells (lanes 4 and 11). In keeping with previous reports^{7,15,24,25}, SAP RNA (third panel) was present in thymocytes (lane 1), splenic T cells (lane 2) and NK cells (lanes 4 and 11). The specificity of these PCR reactions was demonstrated by testing RNA samples from Cos-1 cells transfected

with cDNAs coding for SAP (lane 7), EAT-2 (lane 8) or ERT (lane 9). The expression patterns of the SAP-related proteins were also confirmed by immunoblotting (**Supplementary Fig. 1 online**).

Enhanced NK functions without EAT-2 or ERT

Mice lacking EAT-2 or ERT were generated by homologous recombination. After transfection of the constructs (**Fig. 2a**) in mouse embryonic stem (ES) cells, 129/Sv mice homozygous for disruption of the *Sh2d1b* or *Sh2d1c* gene were created (data not shown). Immunoblotting of NK cell lysates with an antibody specific for EAT-2 confirmed the lack of EAT-2 in *Sh2d1b*^{-/-} mice (**Fig. 2b**, first panel, lane 2). Similarly, depletion of EAT-2 from cell lysates using an EAT-2-specific antibody, followed by immunoprecipitation of ERT with an antibody capable of recognizing ERT, demonstrated the absence of ERT in *Sh2d1c*^{-/-} animals (**Fig. 2c**, first panel, lane 2). Expression of the other SAP-related adaptors was not affected by these mutations (**Fig. 2b,c**). Mice lacking EAT-2 or ERT were apparently healthy and fertile (data not shown). Moreover, they did not exhibit any obvious alteration in NK cell development *in vivo* or *in vitro* (**Supplementary Fig. 2 online**; data not shown). In particular, there was no reproducible change in the proportions of NK cells or the expression of NK cell markers in spleen, thymus, bone marrow and liver (**Supplementary Fig. 2a,b online**; data not shown). Moreover, the number and phenotype of NK cells obtained after *in vitro* activation and expansion with interleukin (IL)-2 were not altered (**Supplementary Fig. 2c online**; data not shown).

IL-2-activated NK cells were obtained from wild-type and EAT-2-deficient animals, and the ability of NK cells to mediate natural cytotoxicity was evaluated (**Fig. 3a**). NK cells were incubated with ^{51}Cr -labeled target cells, and target cell killing was measured by monitoring the release of ^{51}Cr in the supernatant. Compared to wild-type NK cells, EAT-2-deficient NK cells had an increased ability to kill target cells such as CHO and YB. Natural killing of these xenogeneic targets is highly dependent on the capacity of the stimulatory receptor Ly49D to recognize class I MHC on the target cells. Cytotoxicity against other targets like RMA, RMA-S and YAC-1 was not significantly altered.

Similar experiments were performed using IL-2-activated NK cells from ERT-deficient mice (**Fig. 3b**). Lack of ERT resulted in an augmentation of the ability to kill YB cells, although the increase was less pronounced than that seen in EAT-2-deficient NK cells. Moreover, killing of RMA, RMA-S and YAC-1 was not affected. Unlike EAT-2 deficiency, defective ERT expression did not enhance the capacity of NK cells to destroy CHO cells.

Next, we tested the impact of EAT-2 or ERT deficiency on the ability of activating NK receptors to trigger production of IFN- γ . IL-2-activated NK cells were stimulated with antibodies specific for various NK receptors, and subsequent production of IFN- γ was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (**Fig. 3c,d**). NK cells from EAT-2-deficient mice displayed a pronounced increase (4- to 5-fold) in IFN- γ secretion in response to stimulation of CD16, NKG2D or Ly49D (**Fig. 3c**). A smaller (~2- to 3-fold), albeit reproducible, increase in the production of

IFN- γ was also observed in response to 2B4 stimulation. Furthermore, IFN- γ secretion was augmented in unstimulated cells. These effects did not reflect a global enhancement of NK responsiveness, as the response to IL-12, IL-18 or phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin was either minimally elevated or not affected. It is possible that the slightly enhanced IFN- γ secretion seen in response to IL-12, IL-18 or PMA plus ionomycin simply reflected the augmentation of IFN- γ production in unstimulated cells. As was the case for EAT-2-deficient NK cells, ERT-deficient NK cells showed an enhanced response to CD16, Ly49D, NKG2D and, to a lesser extent, 2B4 (**Fig. 3d**; data not shown). Furthermore, responsiveness to IL-12 or PMA plus ionomycin was not affected.

To determine if the increase in NK responsiveness caused by EAT-2 or ERT deficiency was specific to ablation of these proteins, NK functions were also studied in SAP-deficient mice (**Fig. 3e**; ref. 20). Unlike EAT-2- or ERT-deficient NK cells, SAP-deficient NK cells demonstrated no alteration in the ability to kill YB cells. Furthermore, they exhibited a reduced, rather than an increased, capacity to kill RMA-S and C4.4-25, which are class I MHC-negative variants of the CD48-positive targets RMA and EL-4, respectively. Killing of RMA-S and C4.4-25 seems to be highly dependent on the activating function of 2B4²⁰. With the results of Bloch-Queyrat et al.²⁰, these findings indicated that lack of EAT-2 or ERT, and lack of SAP, have strikingly different effects on NK functions.

We also examined the impact of EAT-2 deficiency on the function of freshly isolated NK cells (**Fig. 4a**). NK cells were purified by negative selection from spleen

and their ability to kill target cells *in vitro* was determined. As was the case for IL-2-activated NK cells, *ex vivo* NK cells from EAT-2-deficient mice demonstrated an enhanced capacity to kill YB, but not YAC-1. Likewise, we assayed the capacity of EAT-2-deficient mice to clear YB tumor cells *in vivo*, using an intra-peritoneal tumor clearance assay (**Fig. 4b**). *Sh2d1b*^{-/-} and *Sh2d1b*^{+/+} mice were injected in the peritoneal cavity with 5x10⁶ green fluorescent protein (GFP)-labeled YB cells, and residual GFP-positive cells in the peritoneal cavity were counted after an incubation period of 2 h. In comparison to wild-type mice, mice lacking EAT-2 were more efficient at clearing YB cells. EAT-2 deficiency resulted in an average increase of 27% in the elimination of YB cells from the peritoneal cavity ($p = 0.018$). This was not due to an augmentation of the number of NK cells, as wild-type and EAT-2-deficient mice possessed $22 \pm 11 \times 10^3$ and $20 \pm 10 \times 10^3$ peritoneal NK cells, respectively ($p = 0.256$).

NK inhibition by EAT-2 or ERT

We also examined the impact of enhanced EAT-2, ERT or SAP expression on NK functions (**Fig. 5; Supplementary Fig. 3 online**). A transgenic mouse approach was selected for this purpose, as mouse NK cells are poor recipient for transfection or retrovirus-mediated gene transfer. cDNAs coding for EAT-2 or SAP were cloned in a CD2 promoter-driven construct, and transgenic mice were created. Overexpression of EAT-2 or SAP was confirmed by immunoblotting of cell lysates with anti-EAT-2 (**Fig. 5a**, first panel) or anti-SAP (second panel), respectively. Likewise, augmented

expression of ERT was demonstrated by immunoblotting of cell lysates with an antibody that can recognize both EAT-2 and ERT (**Supplementary Fig. 3a online**).

First, natural cytotoxicity was examined (**Fig. 5b; Supplementary Fig. 3b online**). As expected from the enhanced responsiveness observed in EAT-2-deficient NK cells, augmented expression of EAT-2 suppressed the ability of NK cells to kill targets (**Fig. 5b**). This effect was broader than that observed with EAT-2 deficiency, affecting a wider range of targets including RMA-S, YAC-1, YB, CHO and C4.4-25. In contrast, overexpression of SAP markedly enhanced the capacity to kill the CD48-positive target C4.4-25 (**Fig. 5b; Supplementary Fig. 3b online**). A moderate increase in killing of other CD48-positive targets such as RMA, RMA-S and, occasionally, YAC-1 was observed (**Supplementary Fig. 3b online**)(data not shown). However, no effect was noted on the capacity to destroy YB and CHO. In general, the effect of SAP overexpression was opposite of that of SAP deficiency (**Fig. 3e; ref. 20**). The data regarding natural killing in these various mouse strains are summarized in **Supplementary Table I online**.

Next, IFN- γ production was evaluated (**Fig. 5c**). Enforced expression of EAT-2 greatly inhibited IFN- γ production in response to ligation of CD16 or NKR-P1c (NK1.1), a stimulatory NK receptor expressed in C57BL/6, but not 129/Sv mice. A moderate inhibitory effect in response to engagement of 2B4 was observed. In contrast, there was little or no effect on IFN- γ production in response to IL-12 or PMA plus ionomycin. Contrary to EAT-2, SAP had no effect on receptor-mediated IFN- γ production. This result may seem surprising considering the positive effect of

SAP overexpression on killing of certain targets. One reasonable explanation is that endogenous SAP is sufficient to promote IFN- γ secretion.

Inhibitory effects analogous to those of EAT-2 were also observed in mice overexpressing ERT, although the intensity of these effects was generally less than that observed with EAT-2 (**Supplementary Fig. 3b,c online**; data not shown). Therefore, in combination with the data from deficient mouse strains, the results obtained with transgenic mice suggested that EAT-2 and ERT are negative regulators of NK activity, whereas SAP is a positive regulator of NK functions.

An alternative explanation for the inhibitory effect of EAT-2 and ERT on mature NK functions would be that these molecules affect NK cell differentiation. This notion is very unlikely, however, as we found no obvious evidence of altered NK development *in vivo* or *in vitro* in mice lacking EAT-2 or ERT (**Supplementary Fig. 2 online**). Furthermore, we tested the effect of overexpression of EAT-2 in YT-S, a mature human NK cell line (**Supplementary Fig. 4a online**). EAT-2 overexpression markedly inhibited the capacity of YT-S to kill the target cell line K562. We also examined the impact of ectopic expression of EAT-2 in BI-141, a mature mouse T cell line (**Supplementary Fig. 4b online**). EAT-2 strongly suppressed the ability to trigger IFN- γ secretion in response to antibody-mediated stimulation of the T cell antigen receptor. Hence, it is probable that EAT-2 and ERT repress NK responsiveness by regulating mature NK functions and not by altering NK differentiation.

EAT-2 and ERT associate with 2B4

Two possibilities exist to explain the distinct effects of EAT-2 or ERT, and SAP, in NK cells. These divergent activities may reflect differences in the interactions with SLAM-related receptors and/or other receptors, or they may indicate that different SAP family adaptors are coupled to distinct downstream effectors.

To identify the receptors interacting with EAT-2, ERT and SAP in NK cells, these adaptors were immunoprecipitated from mouse NK cells and probed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies (**Fig. 6a**). In these experiments, EAT-2 and ERT were immunoprecipitated together, using a cocktail of antibodies recognizing both molecules. EAT-2 and ERT were associated with a single ~70 kDa-tyrosine phosphorylated protein (p70) (lane 2). A similar polypeptide was detected in anti-SAP immunoprecipitates (lane 4), but not in immunoprecipitates generated with irrelevant antibodies (lanes 1 and 3).

Mouse NK cells express three SLAM-related receptors, 2B4, CRACC and CD84, that have apparent molecular masses between 60 and 70 kDa (our unpublished results). To determine if the 70 kDa-tyrosine phosphorylated protein associated with SAP family adaptors was any of these SLAM-related receptors, immunoprecipitates of SAP-related adaptors were probed with antibodies against these SLAM family members (**Fig. 6b**). EAT-2 and ERT (lane 2), as well as SAP (lane 4), were associated with 2B4 (first panels), but not with CRACC (second panels) or CD84 (third panels). There was no evidence of any association between SAP-related adaptors and other classes of stimulatory receptors including CD16 (data not shown). Thus, EAT-2, ERT and SAP are primarily associated with 2B4 in mouse NK cells.

2B4 is constitutively tyrosine phosphorylated in mouse NK cells, seemingly due to constitutive engagement by CD48 (ref. 21).

EAT-2 and ERT are tyrosine phosphorylated

The differences in the function of EAT-2 or ERT, and SAP, could be due to coupling to distinct downstream signals. In support of this, SAP, but not EAT-2 or ERT, is known to carry an arginine 78-based motif in the SH2 domain that mediates binding to FynT^{26,27}. To ascertain whether EAT-2 and ERT might possess an alternative signaling mechanism, a careful sequence comparison of the SAP-related adaptors was conducted. EAT-2 and ERT primarily differ from SAP in the C-terminal domain (**Fig. 1a**). Although this region is highly conserved between EAT-2 and ERT (72% identity), it is completely divergent between EAT-2 or ERT, and SAP. The C-terminal domains of EAT-2 and ERT contain two tyrosine-based motifs, centered on tyrosine (Y) 120 and Y127, that are not present in SAP and are in a good consensus for tyrosine phosphorylation.

To examine if these tyrosines are phosphorylated, EAT-2 and ERT were immunoprecipitated from mouse NK cells, and probed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies (**Fig. 7a**, top panel). We observed that a 15 kDa-tyrosine phosphorylated polypeptide consistent with EAT-2 and ERT was present in anti-EAT-2 immunoprecipitates (lane 3), but not in immunoprecipitates produced with normal rabbit serum (lane 1). This polypeptide co-migrated with EAT-2 and ERT (bottom panel). There was no detectable tyrosine phosphorylation of SAP (lane 2).

To assess whether EAT-2 is phosphorylated at its C-terminal tyrosines, EAT-2 or an EAT-2 mutant in which both Y120 and Y127 were replaced by phenylalanines ("EAT-2 Y2F") was expressed in a T cell line in the presence of SLAM, which is regulated by homotypic self-association (**Fig. 7b**). After cell lysis, EAT-2 was immunoprecipitated and probed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies (top panel). Although wild-type EAT-2 (lane 2) was tyrosine phosphorylated, EAT-2 Y2F (lane 3) was not phosphorylated. This finding suggested that EAT-2 is phosphorylated at one or both of its C-terminal tyrosines.

Role of the tyrosines of EAT-2

Next, we determined whether the C-terminal tyrosines were required for the inhibitory function of EAT-2 in NK cells. To this end, transgenic mice expressing EAT-2 Y2F in NK cells were generated as detailed above. Immunoblot analyses demonstrated that the EAT-2 amounts present in NK cells from these animals were comparable to those seen in NK cells overexpressing wild-type EAT-2 (**Fig. 8a**, top panel). Despite this, the EAT-2 Y2F mutant did not inhibit natural cytotoxicity (**Fig. 8b**). Likewise, it failed to suppress IFN- γ secretion in response to 2B4, CD16 or NKR-P1c ligation (**Fig. 8c**).

To ensure that mutation of the C-terminal tyrosines did not interfere with the association of EAT-2 with 2B4, NK cells from transgenic and control mice were lysed, and EAT-2 was immunoprecipitated and probed by immunoblotting with anti-2B4 antibodies (**Fig. 8d**, first panel). EAT-2 Y2F (lane 4) was associated with 2B4 to

the same extent as wild-type EAT-2 (lane 3). Similar results were obtained in transiently transfected Cos-1 cells (data not shown). These results suggested that the C-terminal tyrosines of EAT-2 are dispensable for the interaction between EAT-2 and 2B4. They also supported the idea that wild-type EAT-2 inhibits NK functions by an active signaling mechanism, rather than by displacing endogenous SAP-related adaptors from 2B4.

EAT-2 inhibits proximal signaling

A careful examination of the receptors inhibited by EAT-2, i.e. CD16, Ly49D, NKG2D, NKR-P1c and 2B4, indicated that all these receptors function by inducing protein tyrosine phosphorylation¹⁻³. The effects of EAT-2 on intracellular protein tyrosine phosphorylation were therefore examined (**Fig. 9a,b**). Wild-type and EAT-2-deficient NK cells were stimulated with anti-CD16 antibodies and lysates were probed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies (**Fig. 9a**, top panel). Compared to wild-type NK cells (lanes 1-3), EAT-2-deficient NK cells (lanes 4-6) exhibited an increase in CD16-induced protein tyrosine phosphorylation. Most CD16-regulated substrates were affected by this augmentation. This suggests that EAT-2 was inhibiting proximal events in NK signaling. To validate this conclusion, protein tyrosine phosphorylation was also examined in NK cells overexpressing EAT-2 (**Fig. 9b**). Basal protein tyrosine phosphorylation was reduced in EAT-2-overexpressing NK cells (lane 4). Moreover, CD16-induced protein tyrosine phosphorylation was completely abrogated (compare lane 3 and lane 6). A similar inhibitory effect was seen in cells stimulated via 2B4 (**Fig. 9c**).

Finally, we tested whether the inhibition of protein tyrosine phosphorylation was dependent on the C-terminal tyrosines of EAT-2 (**Fig. 9c**). Contrary to wild-type EAT-2 (lanes 4-6), the EAT-2 Y2F mutant (lanes 7-9) did not suppress baseline or 2B4-induced protein tyrosine phosphorylation. In fact, it caused an overall increase in protein tyrosine phosphorylation, suggesting that it had a dominant-negative effect. However, this effect was partial, because EAT-2 Y2F did not cause any enhancement of natural cytotoxicity or IFN- γ release (see **Fig. 8**).

DISCUSSION

We found that mice lacking EAT-2 or ERT had no appreciable defect in NK development. However, IL-2-activated NK cells from these mice had an increased ability to secrete IFN- γ in response to stimulation of CD16, NKG2D, Ly49D and 2B4. EAT-2-deficient IL-2-activated NK cells also exhibited an enhanced capacity to kill target cells such as YB and CHO, while ERT-deficient NK cells had an increased cytotoxic response towards YB. NK-mediated killing of YB and CHO, two xenogeneic target cells, is highly dependent on recognition of class I MHC on these targets by activating NK receptor Ly49D. The augmented natural cytotoxicity towards YB target was also seen with freshly isolated NK cells and in an intra-peritoneal tumor clearance assay.

The impact of EAT-2 or ERT deficiency was distinct from that of SAP deficiency. SAP-deficient NK cells were less efficient, instead of more efficient, at killing target cells. Furthermore, the type of target cells affected by SAP was different from that influenced by EAT-2 or ERT. In general, SAP-dependent killing correlated with expression of CD48, the ligand of 2B4, on target cells²⁰. Furthermore, SAP-deficient NK cells exhibited a decrease, rather than an increase, in 2B4-triggered IFN- γ release²⁰.

While the conclusions reached with adaptor-deficient NK cells were further supported by our overexpression studies, it is noteworthy that augmented expression of EAT-2 or ERT, in comparison to deficiency of either adaptor, impacted on a broader range of targets in natural cytotoxicity assays. This difference might reflect

partial compensation by ERT or EAT-2 in NK cells lacking EAT-2 or ERT, respectively. Alternatively, it may reflect a loss of specificity of EAT-2 and ERT in the context of overexpression.

These various data indicated that EAT-2 and ERT inhibit the functions of several stimulatory NK receptors. In contrast, SAP is principally implicated in promoting the activity of 2B4. What explains these functional differences? It seems unlikely that a divergence in the type of receptors interacting with the adaptors is responsible. EAT-2, ERT and SAP interacted exclusively with 2B4 in NK cells. None was detectably associated with other types of receptors. Thus, the distinct roles of EAT-2 or ERT, and SAP, are likely caused by differences in their signaling mechanism. In agreement with this, SAP, but not EAT-2 or ERT, is able to recruit the Src-related kinase FynT^{26,27}, and this activity is critical for the capacity of SAP to promote the activating function of 2B4 (ref. 21). Additionally, EAT-2 and ERT, but not SAP, possess two tyrosines in their C-terminal tail that undergo phosphorylation. Since mutation of these tyrosines eliminated the inhibitory effect of EAT-2, we postulate that the inhibitory effect of EAT-2 and ERT is caused by a distinctive mechanism implicating tyrosine phosphorylation of their tail.

EAT-2 and ERT may be involved in a phenomenon referred to as “non-MHC-dependent NK inhibition”⁸. Whereas most mature NK cells express class I MHC-specific inhibitory receptors that prevent inappropriate NK reactivity, some NK populations, including immature NK cells and a subset of mature NK cells (~10% in C57BL/6 mice), express little or no self-class I MHC-reactive inhibitory receptors²⁸. In spite of this, these cells are self-tolerant. These observations imply that other

inhibitory mechanisms repress their function. Although the identity of these mechanisms remains to be formally established, receptors such as 2B4 have been proposed to play an important role. Given the association of 2B4 with EAT-2 and ERT, these adaptors may obviously participate in non-MHC-dependent NK inhibition.

Our results also provide a plausible explanation for the dual ability of 2B4 to mediate stimulatory or inhibitory signals in NK cells. As revealed by analyses of SAP-deficient NK cells¹⁶⁻²¹, the activating function of 2B4 seems to be dependent on SAP. In contrast, the ability of 2B4 to inhibit NK cell activity may be mediated by EAT-2 and ERT. This may explain why 2B4 is especially inhibitory in immature NK cells, which express little or no SAP but express EAT-2, or in NK cells derived from SAP-deficient humans and mice^{17,20,28}. Nonetheless, other mechanisms may also contribute to 2B4-mediated inhibition. 2B4 can associate *in vitro* with other negative regulators such as the phosphatases SHP-1, SHP-2, SHIP, and the inhibitory PTK Csk²⁹.

The common feature shared by the NK receptors inhibited by EAT-2 and ERT is their utilization of Src family kinases¹⁻³. CD16, Ly49D, NKG2D and NKR-P1c are associated with ITAM-containing sub-units, which necessitate Src-related PTKs for tyrosine phosphorylation. Moreover, 2B4 is associated with SAP, which uses FynT for its activating function²¹. Since our studies also showed that EAT-2 inhibits the most proximal signals triggered by engagement of CD16 or 2B4, that is, protein tyrosine phosphorylation, we propose that EAT-2 and ERT inhibit NK functions by

uncoupling activating NK receptors from Src kinase-dependent phosphorylation. The mechanism of this inhibition remains to be clarified.

It may seem surprising that EAT-2 or ERT deficiency caused an enhancement of IFN- γ secretion by a wide range of activating NK receptors, whereas it augmented cytotoxicity towards only a limited number of target cells. However, this situation is not unheard of. An earlier report showed that NK cells lacking ZAP-70 and Syk (which are targets of Src kinases) exhibited marked defects in receptor-triggered IFN- γ release, while natural killing of several targets was unaltered³⁰. The only target affected was CHO, which was killed much less efficiently by the mutant NK cells. This is presumably because natural cytotoxicity occurs in part through Src kinase-independent pathways. A related discrepancy was observed in NK cells devoid of CD45, a protein tyrosine phosphatase required for Src kinase activation³¹. Because EAT-2 and ERT seemingly inhibit receptors coupled to Src kinases, it is therefore not unexpected that natural killing was not grossly affected by lack of these molecules. It is also possible that the partial defect in natural killing seen in EAT-2- or ERT-deficient NK cells was due to compensation by the remaining ERT or EAT-2, respectively.

Although the genes coding for EAT-2 and ERT are both operational in mice, only the gene encoding EAT-2 seems to be functional in humans (our unpublished results). The human gene coding for ERT has seemingly evolved into a non-coding pseudo-gene. Given this, it is likely that the combined function of EAT-2 and ERT in mice is served by EAT-2 alone in humans. Therefore, an appreciation of the function

of EAT-2 in humans will likely come with the production of mice lacking both adaptors.

In summary, we determined that EAT-2 and its close relative ERT are negative regulators of NK cell reactivity. Since EAT-2 is also expressed in other innate immune cells like DCs and macrophages, it may provide an analogous function in these cell types. It is tempting to speculate that, as for SAP, mutations or altered expression of EAT-2 may be implicated in human immune dysfunctions. Given that EAT-2 is a negative regulator of NK activation, these alterations might lead to NK cell self-reactivity and auto-immunity.

METHODS

Cells. Immune cells were obtained from C57BL/6 mice (Harlan, Chicago, IL) according to standard protocols³²⁻³⁴. NK cells were isolated from spleen by negative selection, using an NK cell isolation cocktail (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). ~50-60% of purified cells were NKR-P1c⁺ CD3⁻ (in C57BL/6 background) or DX5⁺ CD3⁻ (in all backgrounds)(data not shown). Cells were propagated in medium supplemented with IL-2 (1000 U/ml), and were used for experimentation after 7 days. At that time, greater than 95% of cells were NKR-P1c⁺, 2B4⁺, DX5⁺ and CD3⁻ (data not shown). YAC-1 (H-2^a), RMA (H-2^b), RMA/S (H-2^b-negative), EL-4 (H-2^b), C4.4-25 (H-2^b-negative), CHO and YB2/0 ("YB") were described elsewhere^{20,35}. BI-141-SLAM is a derivative of the mouse T cell line BI-141 that expresses SLAM³⁶. It does not normally express SAP, EAT-2 or ERT (data not shown). Variants expressing wild-type EAT-2 or EAT-2 Y120,127F ("Y2F") were generated by retroviral infection^{21,37}. YT-S is a transformed human NK cell line. It expresses 2B4, SAP and small amounts of EAT-2 (data not shown). Derivatives expressing wild-type human EAT-2 were generated by retroviral infection. K562 is a human erythroleukemia cell line.

DNA constructs. A cDNA encoding mouse EAT-2 was reported elsewhere²⁶. A human cDNA coding for EAT-2 was generated by PCR. The cDNA coding for mouse ERT was kindly obtained from RIKEN, Japan. The nucleotide and amino-acid sequences of ERT were deposited in the National Center for Biotechnology Information database (accession number DQ140178). Point mutations were

introduced using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla, CA).

Mice lacking EAT-2, ERT or SAP and transgenic mice. See **Supplementary Methods online**.

Antibodies. Rabbit antibodies directed against 2B4, SAP and phosphotyrosine were described in other publications^{21,36,38}. Polyclonal rabbit antisera against CRACC and CD84 will be reported elsewhere (our unpublished results). Polyclonal antibodies against EAT-2 were generated in rabbits using a TrpE fusion protein encompassing the C-terminal tail of EAT-2 or a GST fusion construct bearing the SH2 domain of EAT-2. These antibodies reacted against EAT-2 and ERT, but not SAP (**Supplementary Fig. 1a online**). Monoclonal antibodies (MAbs) recognizing EAT-2 (MAbs 15G3 or 5A7) were generated in rats, using a GST fusion protein containing the full-length sequence of EAT-2. MAb 15G3 reacts against EAT-2 and ERT, but not SAP, whereas MAb 5A7 reacts with EAT-2, but not ERT or SAP (**Supplementary Fig. 1a online**). Rat MAbs against SAP will be described elsewhere. Other MAbs were purchased from eBioscience (San Diego, CA) or BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada).

NK cell assays. For measuring IFN- γ production, IL-2-activated NK cells were stimulated in triplicate for 20 h with the indicated concentrations of antibodies coated on plastic, phorbol myristate acetate (PMA; 50 ng.ml⁻¹) plus ionomycin (1 μ g.ml⁻¹), IL-12 (5 ng.ml⁻¹) or IL-18 (20 ng.ml⁻¹). Supernatants were assayed for IFN- γ production by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Natural cytotoxicity was

evaluated using a standard ^{51}Cr release assay. Briefly, IL-2-activated NK cells or *ex vivo* spleen-derived NK cells were incubated for 4 h at 37°C with ^{51}Cr -labeled target cells (5×10^3), at the indicated effector:target ratios. The release of ^{51}Cr in the supernatant was measured using a gamma counter. The percentage of specific lysis was calculated according to the following formula: (experimental-spontaneous release)/(maximum-spontaneous release) $\times 100$. All assays were done in duplicate. YT-S and its derivatives were stimulated with ^{51}Cr -labeled K562 target cells, at the indicated effector:target ratios. Target cell killing was measured as detailed above.

Intra-peritoneal tumor cell clearance assay. 5×10^6 YB tumor cells stably expressing the green fluorescent protein (GFP) were washed, resuspended in phosphate-buffered saline and injected into the peritoneal cavity of mice. Two hours after the injection, mice were killed and peritoneal cells excluding red blood cells were counted. After establishing the proportion of remaining GFP-positive cells by flow cytometry, the absolute number of residual YB cells was determined mathematically. Since the peritoneal clearance of YB was rapid, pairs of individual wild-type and EAT-2-deficient mice were analyzed in sequence, at 15 min-intervals. The number of residual YB cells in each EAT-2-deficient mouse was expressed as the percentage of that found in the wild-type mouse of a pair. At the end of the assay, the proportion of NK cells in the peritoneal cavity was also ascertained, by flow cytometry using anti-CD49b MAb DX5 and anti-CD3 MAb 145-2C11. Absolute NK cell numbers were determined by correcting for the total number of peritoneal cells. To confirm that the rapid peritoneal clearance of YB was dependent on NK activity, mice were injected intra-peritoneally with anti-asialo-GM1 rabbit antibodies (Wako

Chemicals USA, Richmond, VA; 150 µg in phosphate-buffered saline (PBS), given at 24 h and 4 h prior to tumor cell injection). Compared to PBS alone, this treatment resulted in a ~90% reduction of intra-peritoneal NK cells, as well as a 65% decrease in YB clearance (data not shown). For statistical analysis, Student's t-tests were performed with the Microsoft Excel software.

Immunoprecipitations and immunoblots. Immunoprecipitations and immunoblots were performed as described earlier^{38,39}.

RT-PCRs. RT-PCRs were conducted with the Qiagen OneStep RT-PCR kit, according to the protocol outlined by the manufacturer. Oligonucleotides were designed and protocols were optimized to ensure that the reactions were linear and specific (data not shown). Products were resolved in polyacrylamide or agarose gels, and detected by ethidium bromide staining.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank RIKEN for providing the *Sh2d1c* cDNA, as well as Andrew Makrigiannis and members of the Veillette laboratory for useful discussions. We also acknowledge Marcin Bakinowski and Marie-Claude Fondanèche for technical help. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (to A.V.), the National Cancer Institute of Canada (to A.V.), the CANVAC National Centre of Excellence (to A.V.), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to S.L.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France) (to S.L.). R.R. holds a Steve Fonyo Studentship from the National Cancer Institute of Canada. S.L. is a Scientist from the Centre National de la Recherche Scientifique (France). A.V. is a Senior Investigator of the Canadian Institutes of Health Research and holds the Canada Research Chair in Signaling in the Immune System.

REFERENCES

1. Lanier, L. L. NK Cell Recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 225-274 (2005).
2. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 781-790 (2003).
3. Vivier, E., Nunes, J. A., & Vely, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* **306**, 1517-1519 (2004).
4. Mathew, P. A. *et al.* Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J.Immunol.* **151**, 5328-5337 (1993).
5. Valiante, N. M. & Trinchieri, G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J.Exp.Med.* **178**, 1397-1406 (1993).
6. Veillette, A. & Latour, S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **15**, 277-285 (2003).
7. Engel, P., Eck, M. J., & Terhorst, C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 813-821 (2003).
8. Kumar, V. & McNerney, M. E. A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* **5**, 363-374 (2005).
9. Brown, M. H. *et al.* 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J.Exp.Med.* **188**, 2083-2090 (1998).
10. Latchman, Y., McKay, P. F., & Reiser, H. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol.* **161**, 5809-5812 (1998).
11. Veillette, A. SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *J.Exp.Med.* **199**, 1175-1178 (2004).
12. Lee, K. M. *et al.* 2B4 Acts As a Non-Major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells. *J Exp Med* **199**, 1245-1254 (2004).
13. Vaidya, S. V. *et al.* Targeted Disruption of the 2B4 Gene in Mice Reveals an In Vivo Role of 2B4 (CD244) in the Rejection of B16 Melanoma Cells. *J Immunol.* **174**, 800-807 (2005).

14. Nichols, K. E., Ma, C. S., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L., & Tangye, S. G. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol.Rev.* **203**, 180-199 (2005).
15. Latour, S. & Veillette, A. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin.Immunol.* **16**, 409-419 (2004).
16. Nakajima, H. *et al.* Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur.J Immunol.* **30**, 3309-3318 (2000).
17. Parolini, S. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp.Med.* **192**, 337-346 (2000).
18. Tangye, S. G., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Nichols, K. E. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol.* **165**, 2932-2936 (2000).
19. Benoit, L., Wang, X., Pabst, H. F., Dutz, J., & Tan, R. Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol.* **165**, 3549-3553 (2000).
20. Bloch-Queyrat, C. *et al.* Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J. Exp. Med.* **202**, 181-92 (2005).
21. Chen, R. *et al.* Molecular Dissection of 2B4 Signaling: Implications for Signal Transduction by SLAM-Related Receptors. *Mol.Cell Biol.* **24**, 5144-5156 (2004).
22. Thompson, A. D. *et al.* EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* **13**, 2649-2658 (1996).
23. Morra, M. *et al.* Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J* **20**, 5840-5852 (2001).
24. Nichols, K. E. *et al.* Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13765-13770 (1998).

25. Coffey, A. J. *et al.* Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat.Genet.* **20**, 129-135 (1998).
26. Latour, S. *et al.* Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat.Cell Biol.* **5**, 149-154 (2003).
27. Chan, B. *et al.* SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* **5**, 155-160 (2003).
28. Sivori, S. *et al.* Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 4526-4531 (2002).
29. Eissmann, P. *et al.* Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* **105**, 4722-4729 (2005).
30. Colucci, F. *et al.* Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat.Immunol.* **3**, 288-294 (2002).
31. Huntington, N. D., Xu, Y., Nutt, S. L., & Tarlinton, D. M. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J.Exp.Med.* **201**, 1421-1433 (2005).
32. Veillette, A., Thibadeau, E., & Latour, S. High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *J Biol Chem* **273**, 22719-22728 (1998).
33. Davidson, D. & Veillette, A. PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates. *EMBO J* **20**, 3414-3426 (2001).
34. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol.Methods* **223**, 77-92 (1999).
35. Nakamura, M. C. *et al.* Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity. *J.Exp.Med.* **189**, 493-500 (1999).
36. Latour, S. *et al.* Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* **2**, 681-690 (2001).

37. Davidson, D. *et al.* Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity*. **21**, 707-717 (2004).
38. Davidson, D., Chow, L. M., Fournel, M., & Veillette, A. Differential regulation of T cell antigen responsiveness by isoforms of the src-related tyrosine protein kinase p59fyn. *J Exp Med* **175**, 1483-1492 (1992).
39. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., & Bolen, J. B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-308 (1988).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of SAP family adaptors in normal mouse immune cells. (a). Comparison of amino acid sequences of mouse EAT-2, ERT and SAP. The residues that are strictly conserved in all three SAP-related adaptors are shown in the consensus sequence at the bottom. “+” indicates a similar, but not identical, residue. The positions of the SH2 domain and C-terminal tail are highlighted. “&” corresponds to SAP arginine 78, which is the epicentre of the binding site for the FynT SH3 domain. Asterisks highlight the two tyrosines in the tails of EAT-2 and ERT. (b). The positions of the *Sh2b1b* (*eat-2*) and *Sh2d1c* (*ert*) genes, as well as of the *Slam* gene locus, on mouse chromosome 1 are depicted schematically. *Sh2d1b* and *Sh2d1c* are separated from each other by approximately 26 kb, while they are separated from the *Slam* locus by roughly 1,300 kb. The transcriptional orientation of *Sh2d1b* and *Sh2d1c* is indicated by an arrow. (c). RT-PCRs. RT-PCRs were performed using RNA samples from the indicated cell populations. All PCRs were conducted under linear assay conditions. These experiments are representative of at least five independent experiments.

Figure 2. Generation of *Sh2d1b*^{-/-} and *Sh2d1c*^{-/-} mice. (a). A schematic representation of the mouse *Sh2d1b* and *Sh2d1c* genes is shown at the top. The four coding exons are represented as boxes, whereas the positions of the initiating ATGs and the stop codons are shown as right-sided and left-sided arrows, respectively. The targeting vector used is presented in the middle. In essence, the *neo* resistance (*neo*^r) gene was inserted in the antisense orientation in the middle of exon 2 of the genes. The targeted

alleles are depicted at the bottom. **(b)**. The expression of SAP-related adaptors was determined by immunoblotting of equivalent amounts of total cell lysates from IL-2-activated NK cells, using the indicated antibodies. MAb 5A7 (top panel) is a MAb that recognizes EAT-2, but not ERT or SAP. MAb 15G3 (middle panel) is a MAb that reacts with EAT-2 and ERT, but not SAP. **(c)**. In the top panel, lysates were first depleted of EAT-2 by three consecutive rounds of immunoprecipitation with anti-EAT-2 MAb 5A7 (data not shown). Then, ERT was recovered from lysates by immunoprecipitation with MAb 15G3, which recognizes ERT (and EAT-2). Immunoreactive products were detected by immunoblotting with a rabbit anti-EAT-2 and ERT serum. In the middle panel, EAT-2 was detected by immunoprecipitation with anti-EAT-2 MAb 5A7 and subsequent immunoblotting with MAb 15G3. All these studies are representative of at least three independent experiments.

Figure 3. Functional characterization of IL-2-activated NK cells from EAT-2-deficient and ERT-deficient mice. **(a)** and **(b)**. IL-2-activated NK cells were obtained from the indicated mice. They were then tested in *in vitro* cytotoxicity assays, using the specified targets labelled with ^{51}Cr and at the indicated effector:target ratios (abscissa). Target cell lysis (ordinate) was measured after 4 h and is expressed as percent of maximum release. All assays were done in duplicate. Ranges are shown as error bars. The following targets were utilized: RMA, a class I MHC (H-2^b)-positive CD48-positive mouse T cell lymphoma; RMA-S, an antigen processing (TAP)-deficient variant of RMA; YAC-1, a class I MHC (H-2^a)-positive CD48-positive mouse T cell thymoma; YB2/0 (YB), a class I MHC-positive rat myeloma cell line;

CHO, a class I MHC-positive hamster ovary cell line. WT: wild-type control mice. (c) and (d). IFN- γ release. IL-2-activated NK cells were stimulated with the indicated antibodies (at 1.0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) coated on plastic. Anti-class I MHC H-2D^b MAb KH95 was used as isotype control. Other controls included a combination of PMA and ionomycin (P+I), IL-12 or IL-18. After 20 h, the release of IFN- γ in the supernatant was determined by ELISA. Assays were done in triplicates. The ranges of the triplicate values are shown with error bars. Two different experiments are shown in c. (e). Natural cytotoxicity in SAP-deficient NK cells. The impact of SAP deficiency on the ability of NK cells to kill targets was ascertained as detailed for a and b. All these studies are representative of at least five independent experiments.

Figure 4. Impact of EAT-2 deficiency on *ex vivo* and *in vivo* NK functions. (a). NK cells were purified from mouse spleen as detailed in Methods. After correcting for the percentage of NK cells (DX5⁺CD3⁻ cells) in these preparations, NK cells were tested in *in vitro* cytotoxicity assays, as detailed in the legend of Fig. 3a. All assays were done in duplicate. Ranges are shown as error bars. This experiment is representative of three different experiments. (b). GFP-positive YB cells were injected in the peritoneal cavity of *Sh2d1b*^{+/+} (n = 6) and *Sh2d1b*^{-/-} (n = 6) mice. After 2 h, peritoneal cells were collected and residual YB cells were numbered as explained in the Methods sections. Given the rapidity of clearance of YB, mice were analyzed in pairs of one wild-type and one EAT-2-deficient mouse. Residual YB cell numbers obtained for individual EAT-2-deficient mice are represented as the percentage of those

observed with the wild-type mice of each pair. Peritoneal clearance of YB is dependent on proper NK activity, as it was compromised by pretreatment of mice with anti-asialo-GM1 antibodies (see Methods).

Figure 5. Functional analyses of NK cells from transgenic mice overexpressing EAT-2 or SAP. **(a).** IL-2-activated NK cells were generated from transgenic mice expressing wild-type EAT-2 (EAT-2 wt) or SAP, and lysates were probed by immunoblotting with anti-EAT-2 (top panel) or anti-SAP (bottom panel). **(b).** Natural killing assays were performed as outlined in the legend of Fig. 3a,b. C4.4-25 is a class I MHC-negative CD48-positive variant of mouse T cell thymoma cell line EL-4. **(c).** IFN- γ release. These experiments were performed as described for Fig. 3c,d, except that various concentrations (shown in brackets) of stimulatory antibodies were used. All these experiments were repeated at least five times.

Figure 6. Association of EAT-2 and ERT, and SAP, with 2B4, but not other SLAM-related receptors, in mouse NK cells. **(a).** The indicated SAP-related adaptors were immunoprecipitated from IL-2-activated mouse NK cells, resolved in 8% gels and probed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (P-Tyr). Anti-EAT-2 used for immunoprecipitation reacts with both EAT-2 and ERT. Anti-CD4 (GK1.5) was used as control antibody. IgH: heavy chain of IgG. Efficient immunoprecipitation of the SAP-related adaptors was verified by probing parallel immunoprecipitates with anti-EAT-2 and ERT and anti-SAP (data not shown). **(b).** Association of 2B4 with SAP-

related adaptors in NK cells. Immunoprecipitates of SAP family adaptors were reprobed by immunoblotting with anti-2B4 (top panels), anti-CRACC (middle panels) and anti-CD84 (bottom panels). The migration of the various SLAM-related receptors was verified by immunoblotting of total cell lysates with the specified antibodies (lane 5). Longer autoradiographic exposures of these blots failed to show any evidence of association between SAP-related adaptors and CRACC or CD84 (data not shown). These experiments were repeated at least three times.

Figure 7. EAT-2 and ERT, but not SAP, are tyrosine phosphorylated in mouse NK cells. **(a).** SAP-related adaptors were immunoprecipitated from lysates of IL-2-activated mouse NK cells, and their phosphotyrosine content was assessed by immunoblotting with anti-P-Tyr (top panel). Lanes 1: normal rabbit serum; 2: SAP; 3: EAT-2 and ERT. Efficient immunoprecipitation of the SAP-related adaptors was verified by reprobing the immunoblot membrane with a mixture of anti-SAP and anti-EAT-2 (bottom panel). **(b).** Evidence that the C-terminal tyrosines of EAT-2 are phosphorylated. EAT-2 was immunoprecipitated from BI-141 cells expressing SLAM in the presence of the indicated EAT-2 polypeptides, and its phosphotyrosine content was ascertained by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (P-Tyr) (top panel). Levels of EAT-2 were controlled by reprobing with anti-EAT-2 (bottom panel). WT: wild-type EAT-2; Y2F: EAT-2 Y2F. These experiments were repeated at least four times.

Figure 8. The C-terminal tyrosines of EAT-2 are required for inhibition of NK cell functions. **(a).** IL-2-activated NK cells were generated from transgenic mice expressing wild-type EAT-2 (WT) or EAT-2 Y120,127F (Y2F), and lysates were probed by immunoblotting with anti-EAT-2 (top panel) or anti-SAP (bottom panel). Ctrl: normal control mouse. **(b).** Natural cytotoxicity assays were performed as outlined in the legend of Fig. 3a,b. **(c).** These experiments were performed as described for Fig. 3c,d. **(d).** The C-terminal tyrosines of EAT-2 do not affect the capacity to associate with 2B4. IL-2-activated NK cells from the indicated mice were lysed, and EAT-2 and ERT were recovered by immunoprecipitation with a cocktail of rat anti-EAT-2 and ERT MAbs (lanes 2-4). Anti-CD4 MAb GK1.5 (lane 1) was used as negative control. The ability of EAT-2 to associate with 2B4 was assessed by probing immunoprecipitates with an anti-2B4 immunoblot (first panel). The presence of EAT-2 in the immunoprecipitates was confirmed by reprobing with anti-EAT-2 (second panel). The abundance of 2B4 and EAT-2 in NK cells was verified by immunoblotting of lysates with anti-2B4 (third panel) and anti-EAT-2 (fourth panel), respectively. Ctrl: normal control mouse; WT: wild-type EAT-2; Y2F: EAT-2 Y2F. These assays were repeated at least three times.

Figure 9. EAT-2 inhibits proximal events in stimulatory NK receptor signaling. **(a).** Enhanced CD16-induced protein tyrosine phosphorylation in EAT-2-deficient NK cells. IL-2-activated NK cells were stimulated or not for 1 min with biotinylated anti-CD16 MAb 2.4G2 or anti-class I MHC MAb KH95, followed by avidin. Changes in protein tyrosine phosphorylation were determined by anti-phosphotyrosine (P-Tyr)

immunoblotting of total cell lysates (top panel). The abundance of 2B4 was assessed by reprobing with a rabbit anti-mouse 2B4 serum (bottom panel). WT: wild-type mouse; KO (“knock-out”): EAT-2-deficient mouse. **(b)**. Decreased CD16-mediated protein tyrosine phosphorylation in NK cells overexpressing wild-type EAT-2. This experiment was performed as outlined for a, except that NK cells from an EAT-2 transgenic (Tg) mouse were used. Note that a slight (~1.3-1.5 fold) decrease in the abundance and a retardation of the electrophoretic mobility of 2B4 (bottom panel) was observed in NK cells overexpressing wild-type EAT-2. The basis and significance of this finding is not known. Ctrl: normal control mouse. **(c)**. The C-terminal tyrosines of EAT-2 are required for inhibition of NK signaling. This experiment was performed as detailed for a, except that NK cells were stimulated or not for 1 min with biotinylated anti-2B4 MAb 2B4 or anti-class I MHC MAb KH95, followed by avidin. Ctrl: normal control mouse; WT: wild-type EAT-2 transgenic mouse; Y2F: EAT-2 Y2F transgenic mouse.

Supplementary Methods

Mice lacking EAT-2, ERT or SAP. Mice lacking EAT-2 or ERT were created by a similar strategy. In brief, the *Sh2d1b* and *Sh2d1c* genes were amplified by PCR from a BAC clone derived from 129/Sv mice, and 5' and 3' genomic fragments were cloned on either side of the *neo* resistance gene in the vector pGT-N28 (New England Biolabs, Beverly, MA). These constructs disrupt exon 2 of the *Sh2d1b* and *Sh2d1c* genes. Based on data obtained by others for the *Sh2d1a* gene, this approach is expected to produce null alleles¹. After linearizing with NotI, the DNAs were electroporated into the ES cell line R1, and transfected cells were selected with G418. Positive clones were injected into blastocysts. Mice with an appropriately recombined *Sh2d1b* or *Sh2d1c* gene were bred to 129/Sv mice. Wild-type littermates were used as controls. SAP-deficient mice were described elsewhere¹. All animal experiments were approved by the IRCM Institutional Animal Committee.

Transgenic mice. To produce EAT-2 or ERT transgenic mice, cDNAs were inserted in a CD2 promoter-driven construct (provided by Dr. D. Kioussis, London, England). Transgenic mice were produced in the mixed C57BL/6-C3H background by the IRCM Transgenic Facility, and were back-crossed for at least 6 generations to the C57BL/6 background. Mice expressing the *sap* transgene were reported elsewhere². Progenies from at least two independent founders were analyzed (data not shown). Flow cytometry. NK cells were detected in various tissues (spleen, thymus, liver, peritoneum) of 129/Sv-derived mice, by staining with a combination of anti-CD49b DX5 and anti-CD3 MAb 145-2C11. NK cells were identified as DX5⁺ CD3⁻ cells. NK cell sub-populations in spleen were further studied by three color-flow cytometry

using anti-CD49b MAb DX5, anti-CD3 MAb 145-2C11 and various antibodies directed against other NK cell surface markers. NK cells were selected by gating on DX5⁺ CD3⁻ cells.

T cell activation. BI-141-SLAM and its derivatives were stimulated at 37°C with the indicated concentrations of anti-CD3 MAb 145-2C11 coated on plastic. After 24 h, supernatants were harvested and assayed for IFN- γ production by ELISA. All assays were done in triplicate, and they were repeated at least three times.

References for Supplementary Methods

1. Yin, L. *et al.* Mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene sap exhibit increased susceptibility to murine gammaherpesvirus-68 and hypo-gammaglobulinemia. *J.Med.Virol.* **71**, 446-455 (2003).
2. Latour, S. *et al.* Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat.Cell Biol.* **5**, 149-154 (2003).



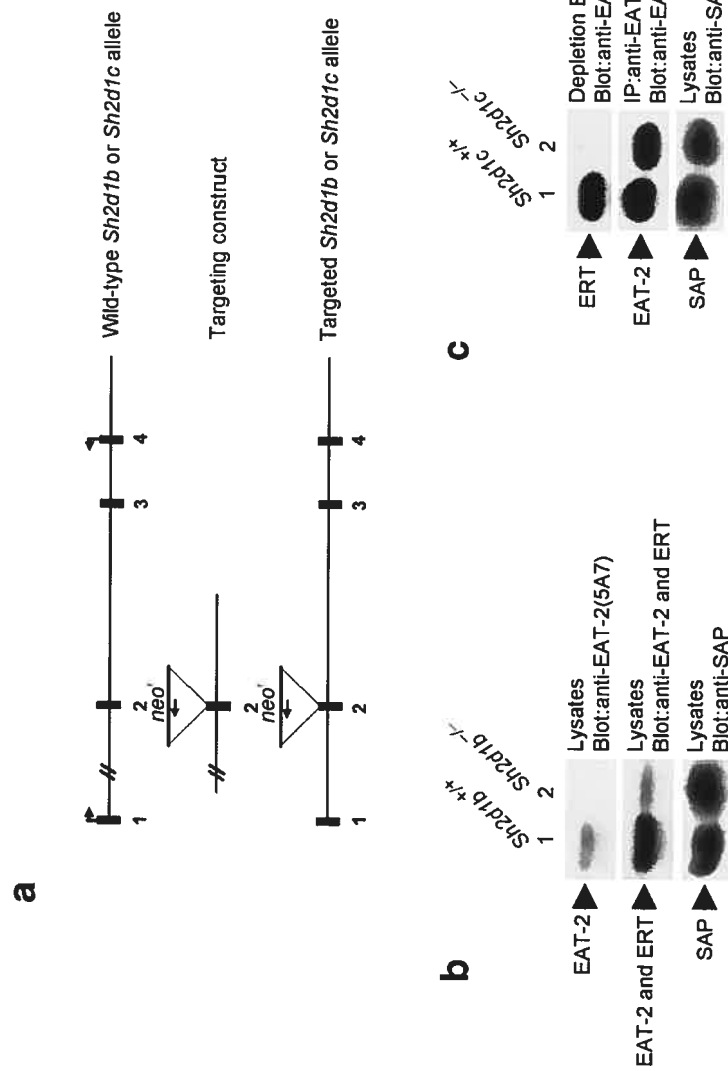


Figure 2

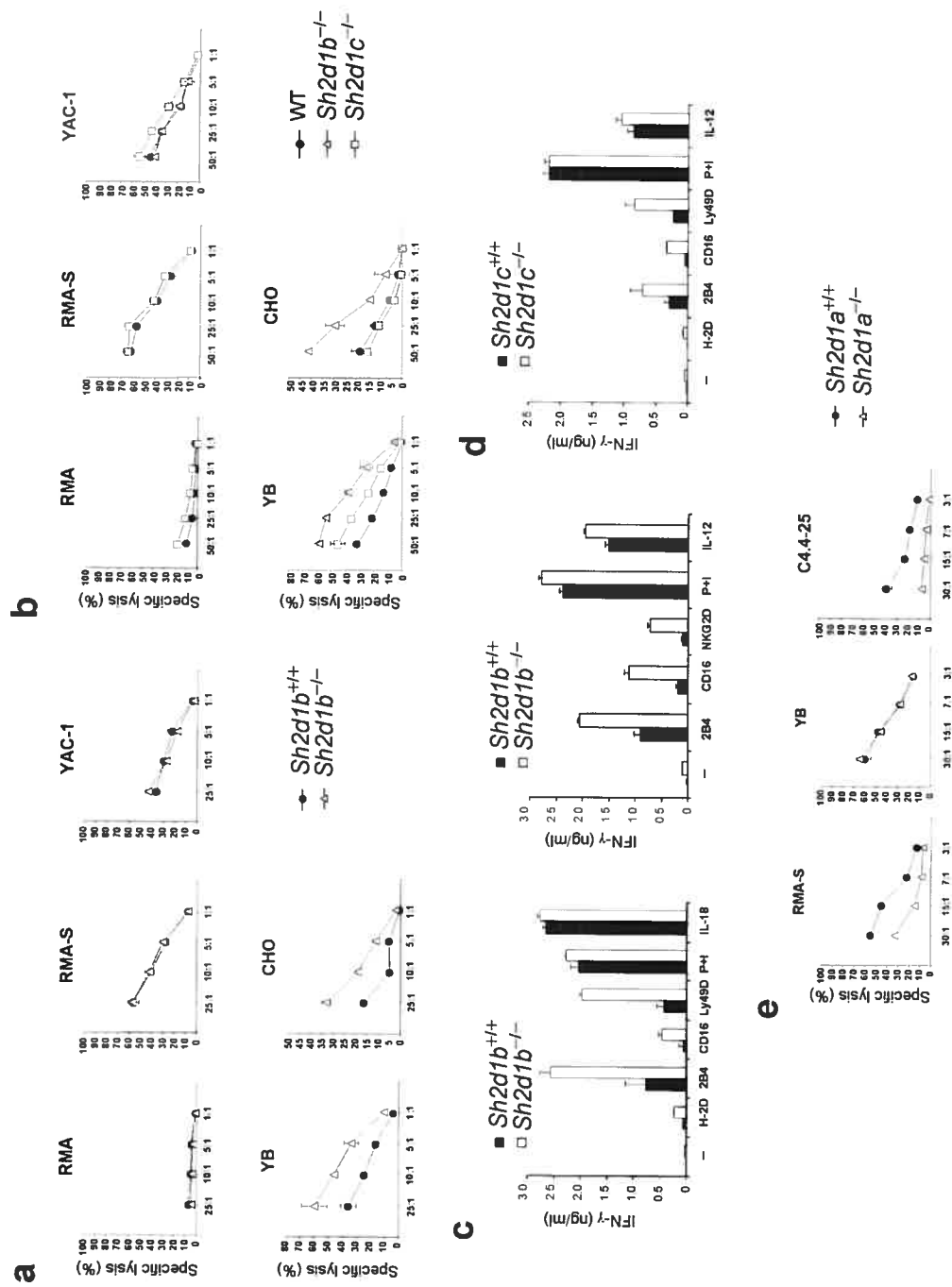


Figure 3

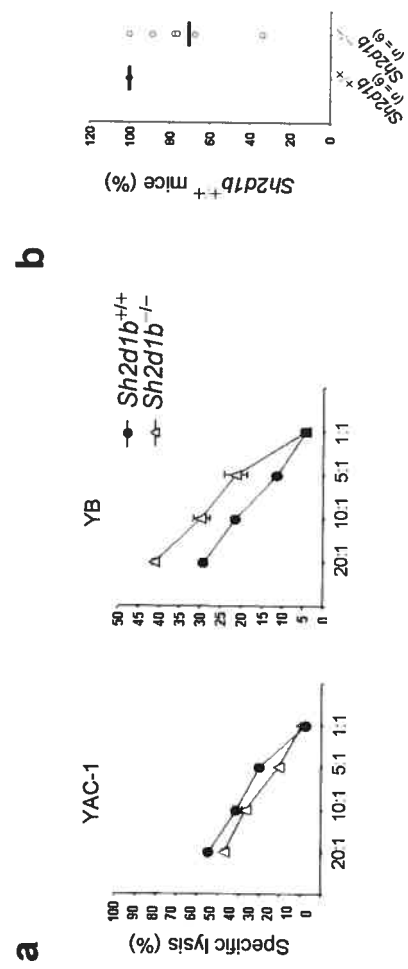


Figure 4

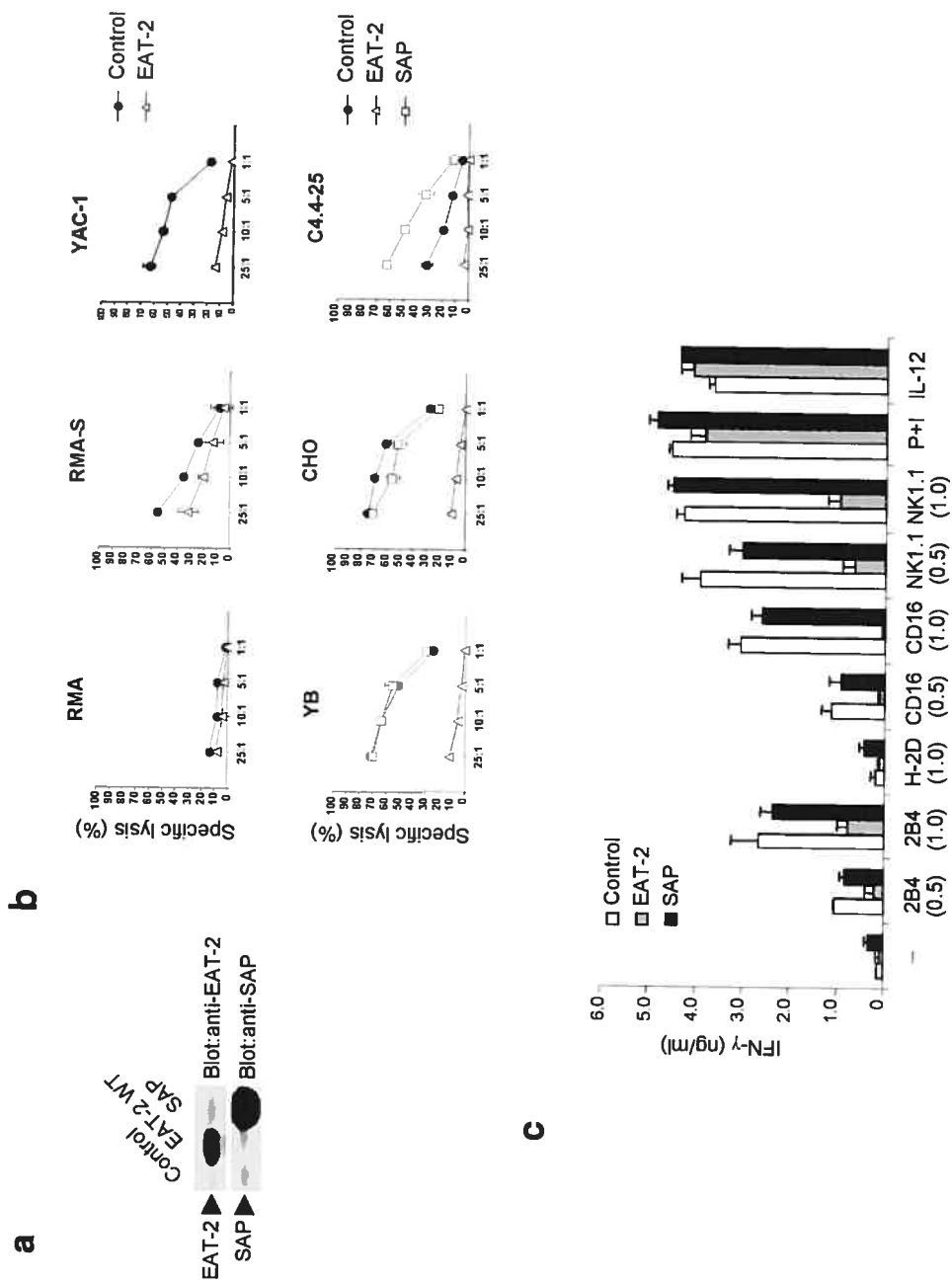


Figure 5

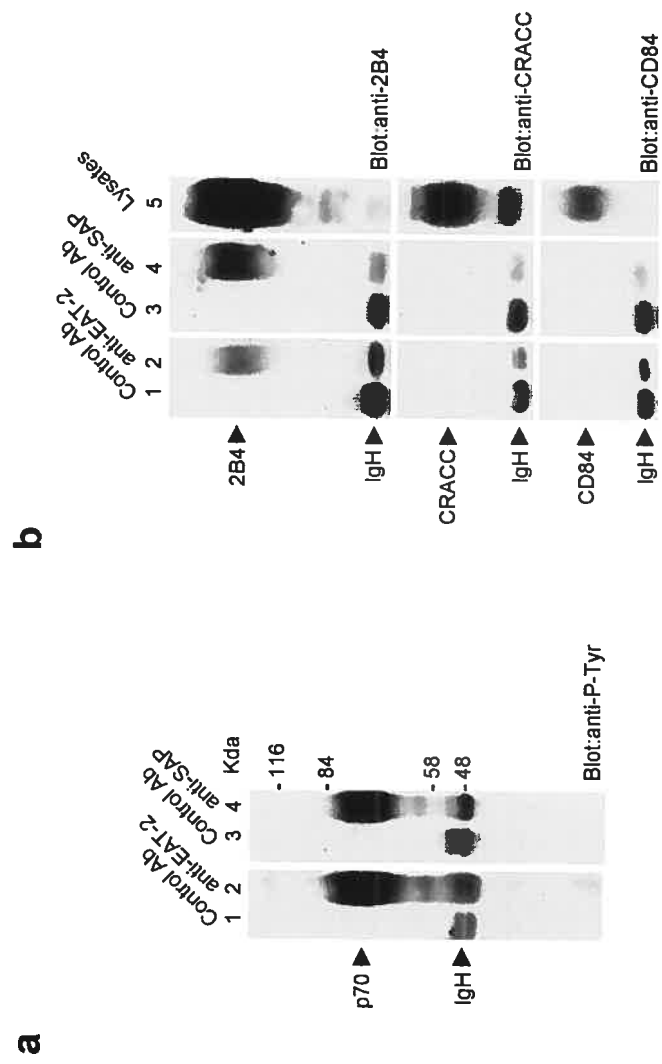


Figure 6

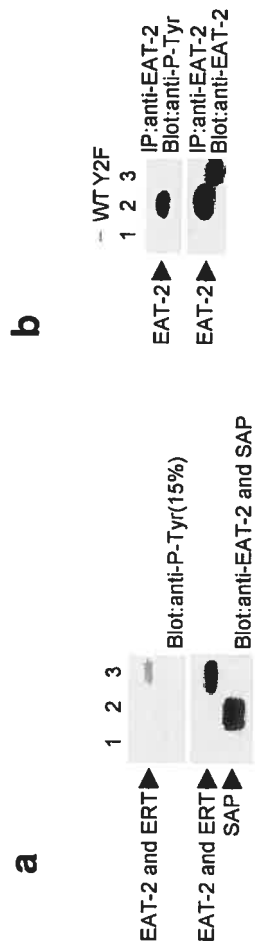
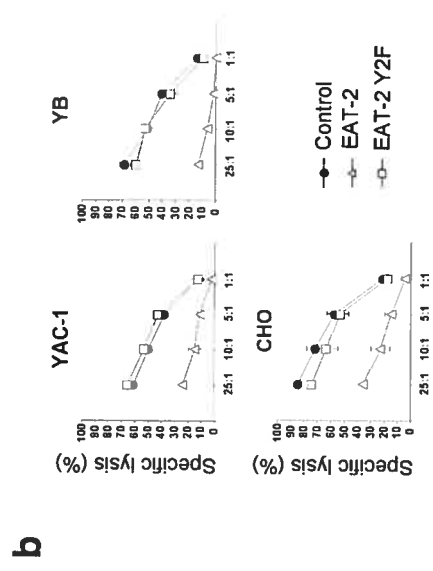
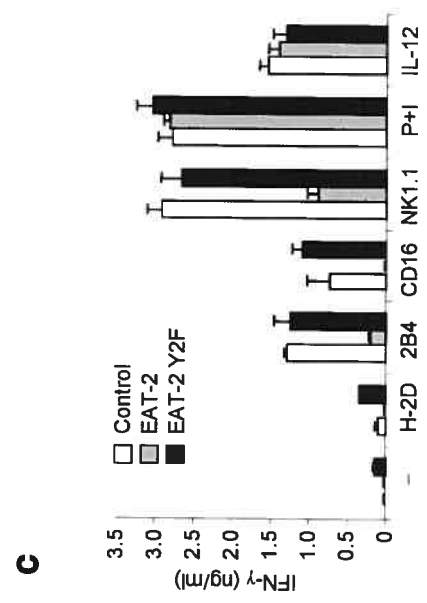


Figure 7



b



d

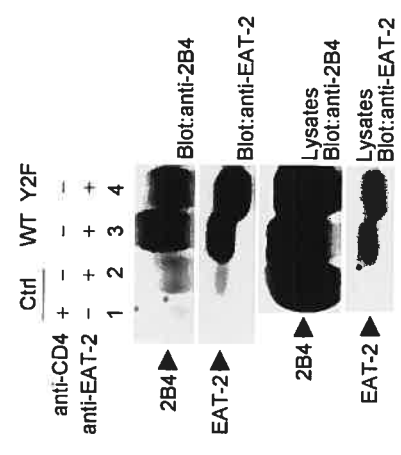


Figure 8

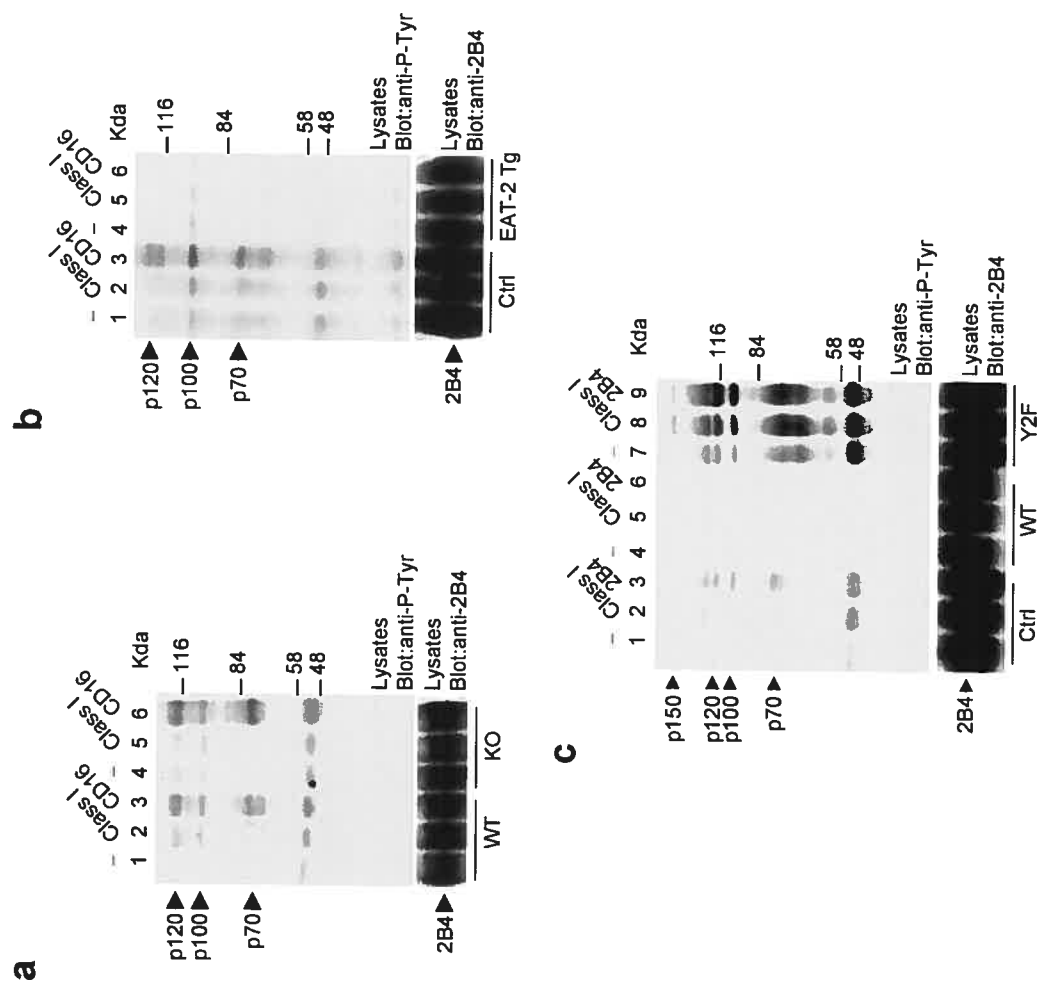
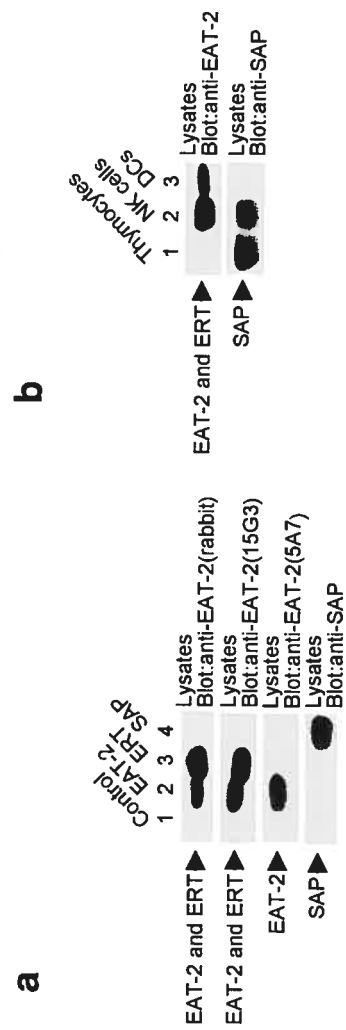
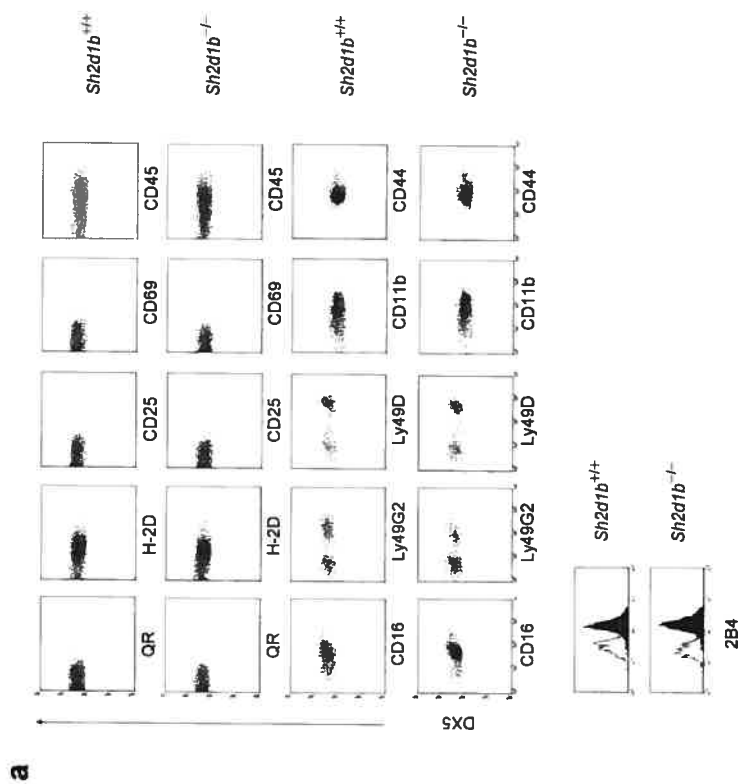


Figure 9

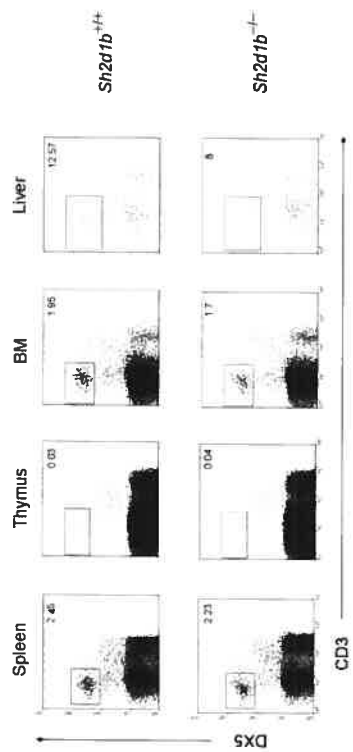


Supplementary Figure 1. Detection of SAP-related proteins in mouse immune cells. (a). Lysates from Bl-141 T cells transfected with individual *Sh2d1a*-related cDNAs were probed by immunoblotting with rabbit anti-EAT-2 (first panel), rat anti-EAT-2 MAb 15G3 (second panel), rat anti-EAT-2 MAb 5A7 (third panel) or rabbit anti-SAP (fourth panel). Note that whereas rabbit anti-EAT-2 and MAb 15G3 recognize both EAT-2 and ERT, MAb 5A7 reacts only with EAT-2. (b). Lysates from the indicated cells were probed by immunoblotting with anti-EAT-2 and ERT (top panel) and anti-SAP (bottom panel).

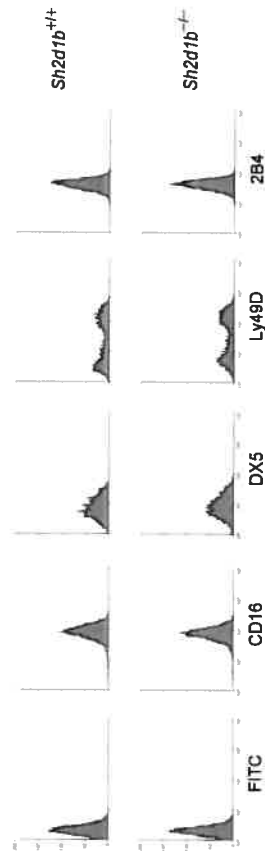


Supplementary Figure 2. NK cell populations in EAT-2-deficient mice. **(a).** Red blood cell-depleted splenocytes were obtained from wild-type and EAT-2-deficient mice, and stained with the indicated antibodies. NK cells were selected for analysis by gating on DX5+CD3- cells.

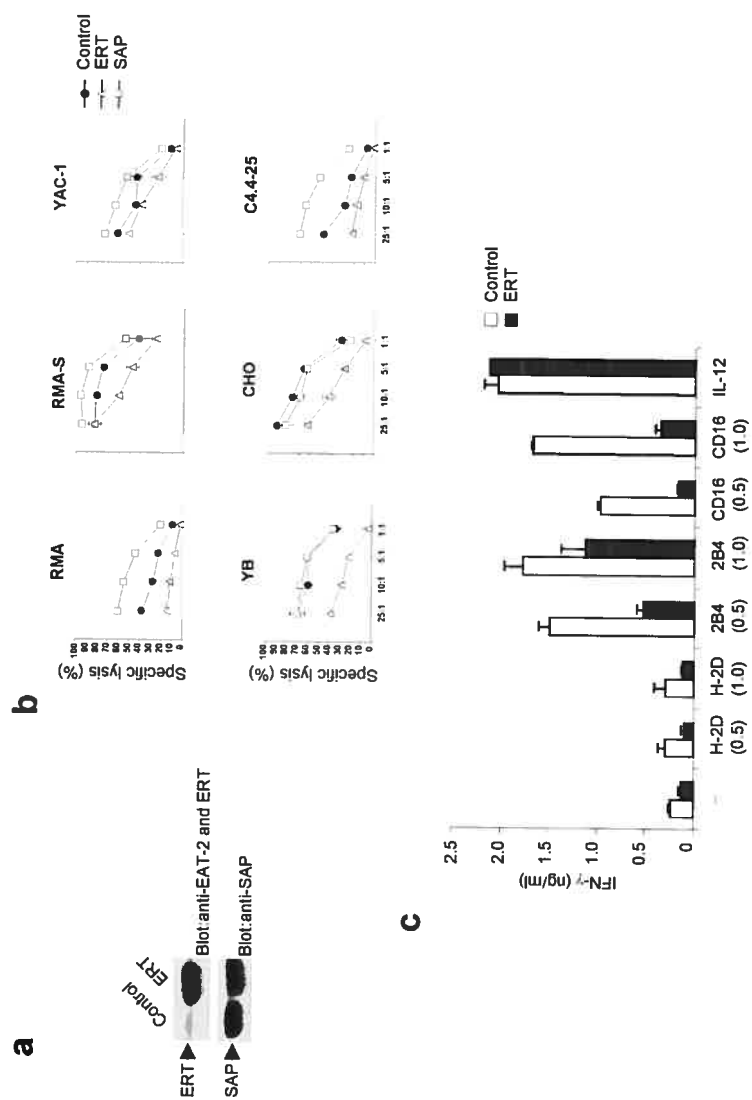
b



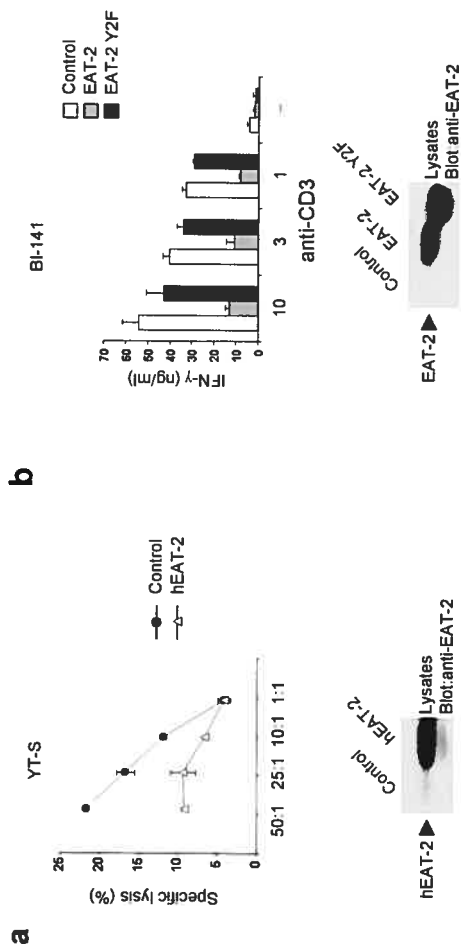
c



Supplementary Figure 2. NK cell populations in EAT-2-deficient mice (cont'd). **(b).** NK cells were identified in various tissues of wild-type and EAT-2-deficient mice by staining single cell suspensions with anti-CD49b MAb DX5 and anti-CD3 145-2C11. DX5+CD3- cells are boxed and their percentage is indicated in the top right corner. **(c).** IL-2-activated NK cells. After 7 days of culture in IL-2-containing medium, spleen-derived NK cells from wild-type and EAT-2-deficient mice were stained with the indicated antibodies. All experiments are representative of at least three independent experiments (data not shown).



Supplementary Figure 3. Analyses of NK functions in ERT transgenic mice. (a). IL-2-activated NK cells were generated from transgenic mice overexpressing ERT, and lysates were probed by immunoblotting with anti-EAT-2 and ERT (top panel) or anti-SAP (bottom panel). (b). Natural cytotoxicity assays were performed as outlined in the legend of Fig. 3a,b. (c). IFN- γ release. These experiments were performed as described for Fig. 3c,d. All experiments are representative of at least three independent experiments (data not shown).



Supplementary Figure 4. Effect of EAT-2 on activating receptors in established cell lines. **(a).** Wild-type human EAT-2 was overexpressed in the human NK cell line YT-S, using retrovirus-mediated transfer with a bicistronic construct encoding GFP and sorting for GFP+ cells. Cells transduced with retroviruses encoding GFP alone were used as control. Natural killing towards K562 was then tested using a ^{51}Cr release assay. Similar results were obtained in at least five independent experiments (data not shown). E:T: effector-to-target cell ratio. Expression levels of EAT-2 are shown at the bottom. A small amount of endogenous EAT-2 was observed in control YT-S cells in longer autoradiographic exposures of this immunoblot (data not shown). **(b).** Inhibition of T cell activation by ectopic expression of EAT-2. Wild-type mouse EAT-2 or EAT-2 Y2F was expressed in a SLAM-expressing derivative of the antigen-specific mouse T cell line Bl-141, as outlined for YT-S cells. Cells transduced with retroviruses encoding GFP alone were used as control. Cells were subsequently stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 MAb 145-2C11 coated on plastic. After 24 h, the production of IFN- γ was determined by ELISA, as outlined in Methods. All assays were done in duplicate. The results presented are representative of at least three independent experiments (data not shown). Expression levels of EAT-2 are shown at the bottom.

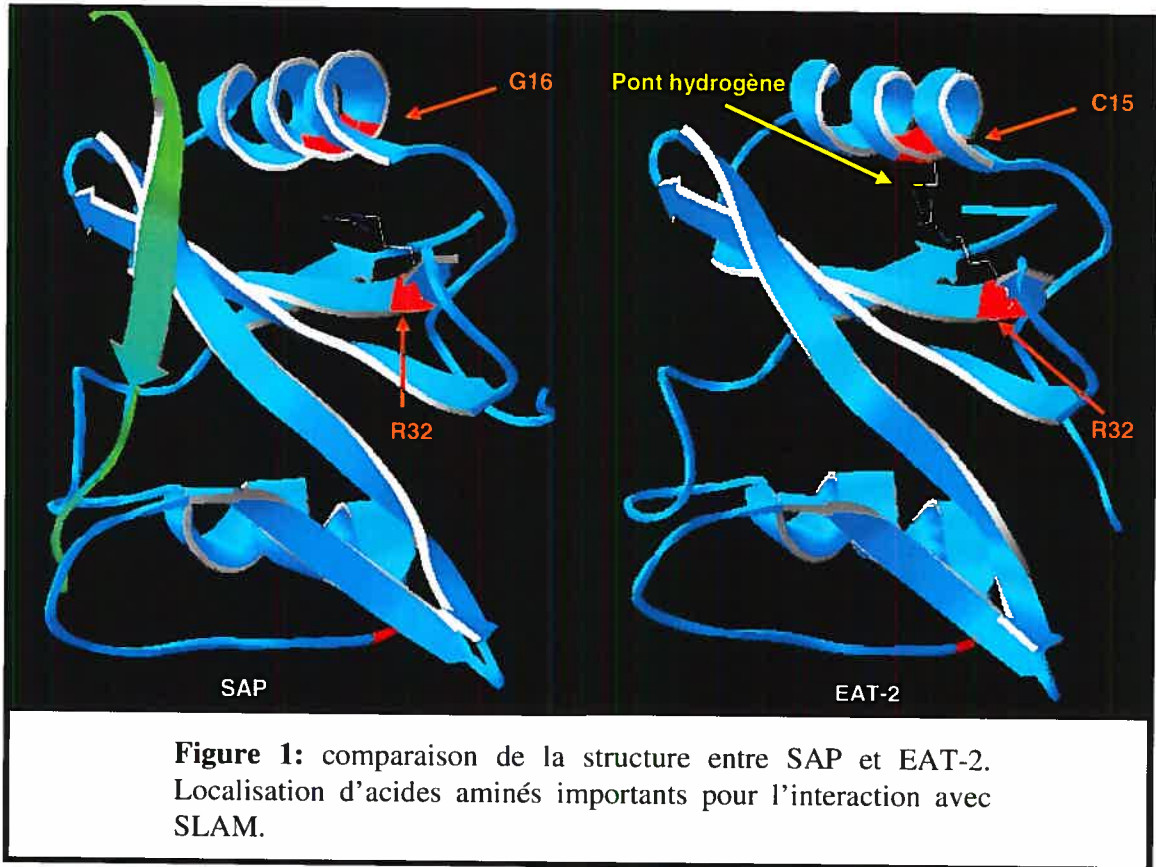
CHAPITRE IV

DISCUSSION

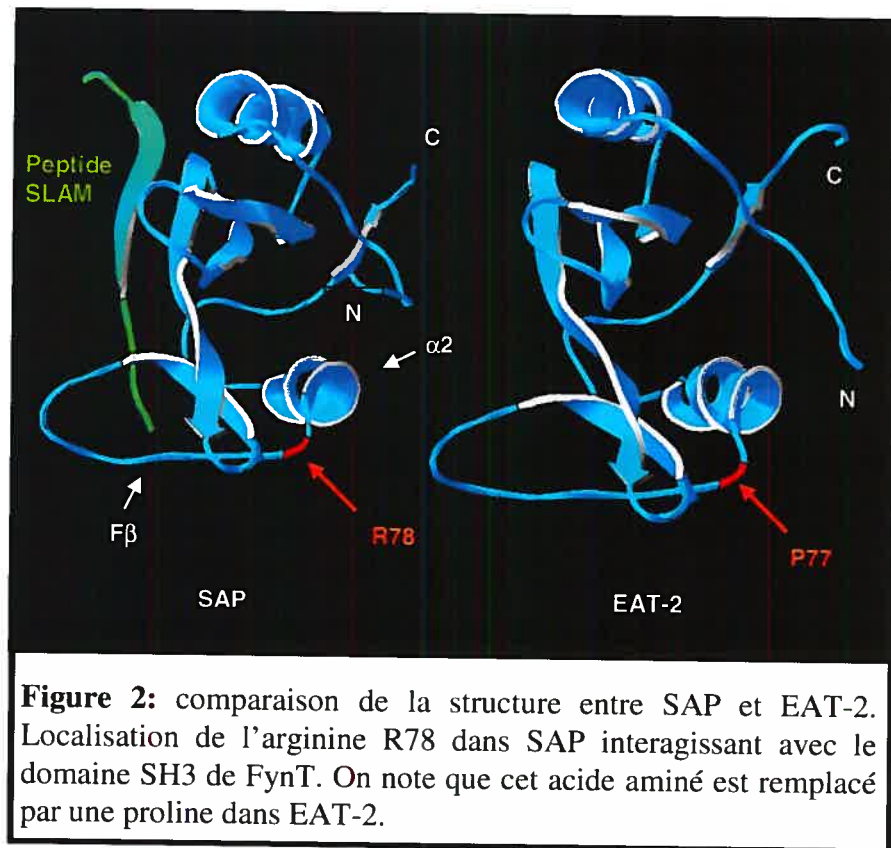
1. Les adaptateurs de la famille SAP : des spécificités essentielles

Au cours des dernières années, l'identification de l'adaptateur SAP et l'étude de son implication dans la régulation des réponses immunes avaient déjà montré l'importance primordiale de cette petite molécule. Il apparaît maintenant particulièrement clair que SAP est requis chez l'humain et la souris dans l'ontogénie des cellules NKT (219, 220), dans la prise de décision Th1/Th2 des cellules T CD4⁺ (157, 158) et dans l'activation optimale des cellules T CD8⁺ et cellules NK (56, 178). Les fonctions de SAP sont dépendantes de son association à des récepteurs de la famille SLAM. Récemment, nos études (Chapitre II) et d'autres (192) se sont intéressées à l'autre membre de la famille SAP, EAT-2. L'examen approfondi de la séquence génomique d'EAT-2 nous a aussi permis d'identifier un nouveau membre à cette famille que l'on a nommé ERT. Comme EAT-2 et ERT possèdent de nombreuses similarités avec SAP, il apparaissait donc important de caractériser ces molécules au vue des connaissances que l'on possédait sur SAP. Tout d'abord, la conservation du domaine SH2 entre ces molécules suggérait qu'EAT-2 et ERT pouvaient être aussi impliqués dans des interactions avec les SRR. Nos résultats montrent qu'en effet EAT-2 et ERT peuvent s'associer aux SRR et en particulier dans des systèmes physiologiques tels que des lignées de cellules T et les cellules NK primaires. Par opposition à SAP, EAT-2 et ERT s'associent de façon phospho-dépendante à SLAM. La présence de la cystéine 15 d'EAT-2 à la place de la glycine 16 de SAP peut expliquer probablement cette différence. Le résidu 15 (ou 16 pour SAP) se retrouve à arrière de l'arginine 31 dans la poche d'interaction recevant la tyrosine phosphorylée de SLAM (Figure 1). La substitution d'une glycine par une cystéine crée un pont hydrogène additionnel qui rend la région plus hydrophile. Cette modification physico-chimique rend probablement défavorable l'association d'EAT-2 à une tyrosine non phosphorylée. SAP, EAT-2 et ERT sont tous capables d'induire un signal intracellulaire après l'engagement des SRR avec lesquels ils sont associés, mais la nature et la manière dont ces signaux sont engendrés sont spécifiques à

chacune de ces molécules. SAP par une séquence unique (centrée sur l'arginine 78) localisée dans son domaine SH2 est capable de recruter et d'activer FynT (Figure 2).



Contrairement à SAP, EAT-2 et ERT ne possèdent pas ce motif et l'arginine 78 est remplacée par une proline incapable d'interagir avec le domaine SH3 de FynT (Figure 2). Si l'on compare les structures tridimensionnelles d'EAT-2 et de SAP, on observe pourtant de grandes similarités qui pourraient suggérer que ces molécules pourraient compétitionner l'une vis-à-vis de l'autre pour les mêmes sites d'interactions. Il est ainsi étonnant de constater que les acides aminés mutés chez les patients atteints d'XLP sont totalement conservés chez EAT-2. Malgré cela EAT-2 est incapable de compenser pour l'absence d'une molécule SAP fonctionnelle.



L'analyse de la région carboxy-terminale d'EAT-2/ERT révèle une complète divergence avec celle de SAP. On note la présence de deux tyrosines dont la phosphorylation promeut l'effet fonctionnel d'EAT-2. Ces tyrosines et en particulier la tyrosine Y127, sont probablement des sites de recrutement pour des domaines SH2 (résultats *in vitro* non montrés). Le rôle inhibiteur d'EAT-2 pourrait donc s'expliquer par le recrutement d'effecteurs secondaires médiateurs d'inhibition intracellulaire. Les premiers candidats évidents sont des phosphatases à tyrosines. En effet, les souris transgéniques surexprimant EAT-2 démontrent un défaut dans l'induction de la phosphorylation des cellules NK stimulées. Inversement, les NK des souris EAT-2 déficientes révèlent une élévation du niveau de phosphorylation. Il est donc probable qu'EAT-2, via ces deux tyrosines Y120 et Y127, puisse recruter et activer des phosphatases telles que SHP-1 et SHP-2. Une autre possibilité serait qu'EAT-2 active Csk, une kinase qui inhibe les Src kinases en phosphorylant leur tyrosine inhibitrice.

Cette éventualité paraît peu probable, la présence des Src kinases étant requise pour le mécanisme d'action d'EAT-2 (voir Chapitre II), il est difficile d'imaginer EAT-2 s'auto-inhiber via Csk et donc limiter drastiquement son action dans le temps. Une autre alternative pour expliquer le mécanisme d'inhibition d'EAT-2 pourrait justement impliquer les Src kinases. En effet, les motifs tyrosines d'EAT-2 sont potentiellement capables de s'associer aux domaines SH2 des Src kinases (résultats *in vitro* non montrés). Dans ces conditions, les Src kinases activées auraient la possibilité de phosphoryler et donc d'activer des récepteurs inhibiteurs tels que les Ly49i se retrouvant à proximité du complexe 2B4-EAT-2. Toutes ces hypothèses découlent de précédents modèles bien caractérisés et définis (28, 29). Ils ont comme particularité commune d'inhiber des voies de signalisations spécifiques de façon contrôlée. Les effets de la signalisation causés par EAT-2, se caractérisent par leurs aspects soutenus, sévères et étendus à de nombreux récepteurs. En effet tous les récepteurs activateurs couplés à des ITAMs se trouvent inhibés par le signal induit par EAT-2. Il paraît donc difficile d'expliquer un tel effet par les hypothèses mentionnées précédemment. Il se pourrait donc qu'EAT-2 induise un signal spécifique, inconnu jusqu'ici qui affecte de manière plus dramatique les voies de signalisations activatrices.

En comparant la séquence humaine d'EAT-2 (hEAT-2) avec celle de la souris (mEAT-2), il apparaît que seule la tyrosine distale Y127 est conservée chez l'humain. Pourtant l'hEAT-2 possède des capacités similaires d'inhibition des cellules NK (voir Chapitre III). Le problème est donc de savoir si la tyrosine Y120 chez mEAT-2 est requise pour la fonction d'EAT-2. On peut imaginer plusieurs explications. Si l'on se rappelle le modèle NKG2D-DAP10/DAP12 chez la souris et l'humain, l'activation de NKG2D chez la souris induit un double signal via DAP10 et DAP12 qui se traduit par l'induction de la cytotoxicité et la production d'IFN- γ respectivement. Les cellules NK humaines exprimant seulement DAP10, l'activation de NKG2D n'active donc que la voie cytotoxique. L'extrapolation de ce modèle à EAT-2 pourrait se traduire ainsi : l'inhibition de mEAT-2 agirait grâce à ces deux tyrosines sur les voies de la production de cytokines et de l'effet cytotoxique, alors

que la tyrosine Y127 d'hEAT-2 provoquerait seulement un effet sur la cytotoxicité des NK. Ce modèle reste évidemment à démontrer mais demeure dans une certaine mesure plausible. Une autre explication à cette divergence pourrait s'appuyer sur le fait qu'mEAT-2 fonctionne sur un mode d'activation séquentiel. Ainsi, on pourrait imaginer la nécessité de phosphoryler la tyrosine Y120 en premier lieu afin que celle-ci amplifie un signal conduisant à la phosphorylation de la dernière tyrosine (Y127). La double phosphorylation serait requise pour obtenir le signal maximal d'EAT-2. *A contrario*, la molécule hEAT-2 aurait développé un mécanisme alternatif, peut-être basé sur sa séquence en amont, qui lui permettrait de générer son signal de façon optimale sans cette tyrosine supplémentaire. Dans ce contexte, il ne faut pas oublier qu'ERT n'est pas exprimé chez l'humain. Au niveau génomique, on constate tout de même la présence de l'exon 1 et la fin de l'exon 4 d'ERT à proximité d'EAT-2 sur le chromosome 1 de l'humain. Il est donc probable que l'humain ancestral ait déjà possédé une molécule ERT fonctionnelle. La dégénération d'ERT chez l'humain peut suggérer plusieurs hypothèses. Premièrement, hEAT-2 est peut-être capable d'induire les signaux d'mEAT-2 et d'ERT à lui tout seul. Alternativement, les cellules NK humaines n'utilisent plus la particularité fonctionnelle d'ERT. Pour répondre à cette question il est nécessaire de connaître la fonction spécifique d'ERT. Les leçons tirées des souris ERT déficientes nous indiquent plutôt un rôle de redondance de cette protéine par rapport à EAT-2. On note tout de même quelques différences intrigantes. La première, c'est la réduction de l'intensité du signal inhibiteur délivré par ERT comparé à EAT-2. L'autre différence s'observe au niveau de la spécificité de l'effet cytotoxique. Ainsi, contrairement aux cellules NK EAT-2^{-/-}, on ne note aucune différence dans la capacité de lyse des cellules NK ERT^{-/-} vis-à-vis des CHO (Chapitre III). Sans en tirer de conclusions définitives, il est probable qu'ERT n'ait pas exactement la même fonction qu'EAT-2. Le rôle inhibiteur d'ERT pourrait être induit par un mécanisme particulier utilisant une voie de signalisation distincte de celle d'EAT-2. Ceci pourrait expliquer à la fois une différence dans l'intensité mais aussi dans la spécificité entre les signaux d'EAT-2 et d'ERT. La comparaison de la séquence de la région carboxy-terminale des deux molécules révèle quelques

Figure 3: Comparaison des séquences carboxy-terminales d'EAT-2 et ERT, accessibilité potentielle

Colonne 1: Séquence en amino-acides

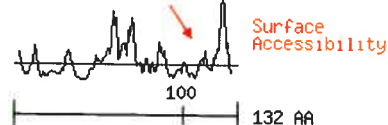
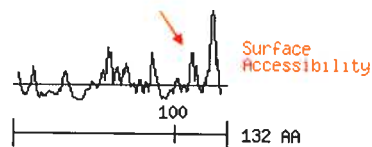
Colonne 2: Accessibilité moyenne de surface sur protéines repliées (Rose et al., Sci. 229, 834 (1985))

EAT-2

R	93.80
R	93.80
M	30.50
E	72.30
L	29.00
E	72.30
L	29.00
N	62.20
V	23.50
Y	59.10
E	72.30
N	62.20
T	46.00
D	60.90
K	110.30
E	72.30
Y	59.10
V	23.50
D	60.90
V	23.50
L	29.00
P	53.70

ERT

R	93.80
R	93.80
L	29.00
N	62.20
L	29.00
E	72.30
A	31.50
N	62.20
V	23.50
Y	59.10
E	72.30
N	62.20
T	46.00
D	60.90
E	72.30
E	72.30
Y	59.10
V	23.50
D	60.90
V	23.50
L	29.00
P	53.70

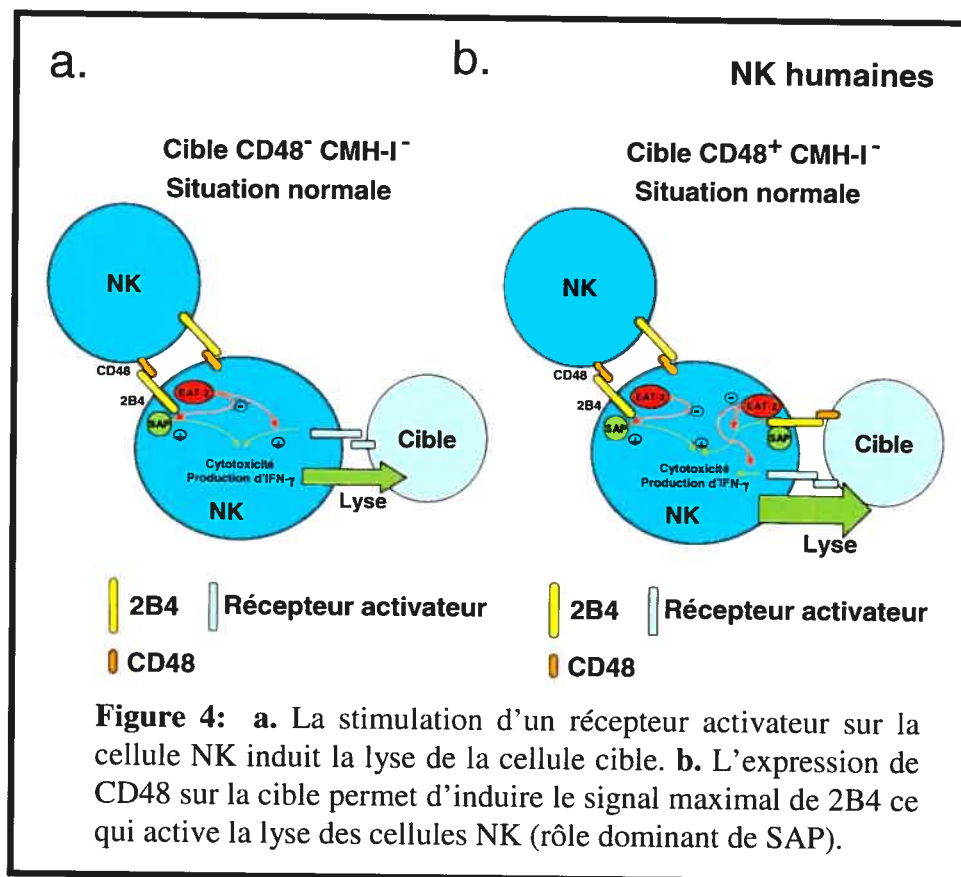


Graphes d'accessibilité générés par Scansite du MIT (<http://scansite.mit.edu>)

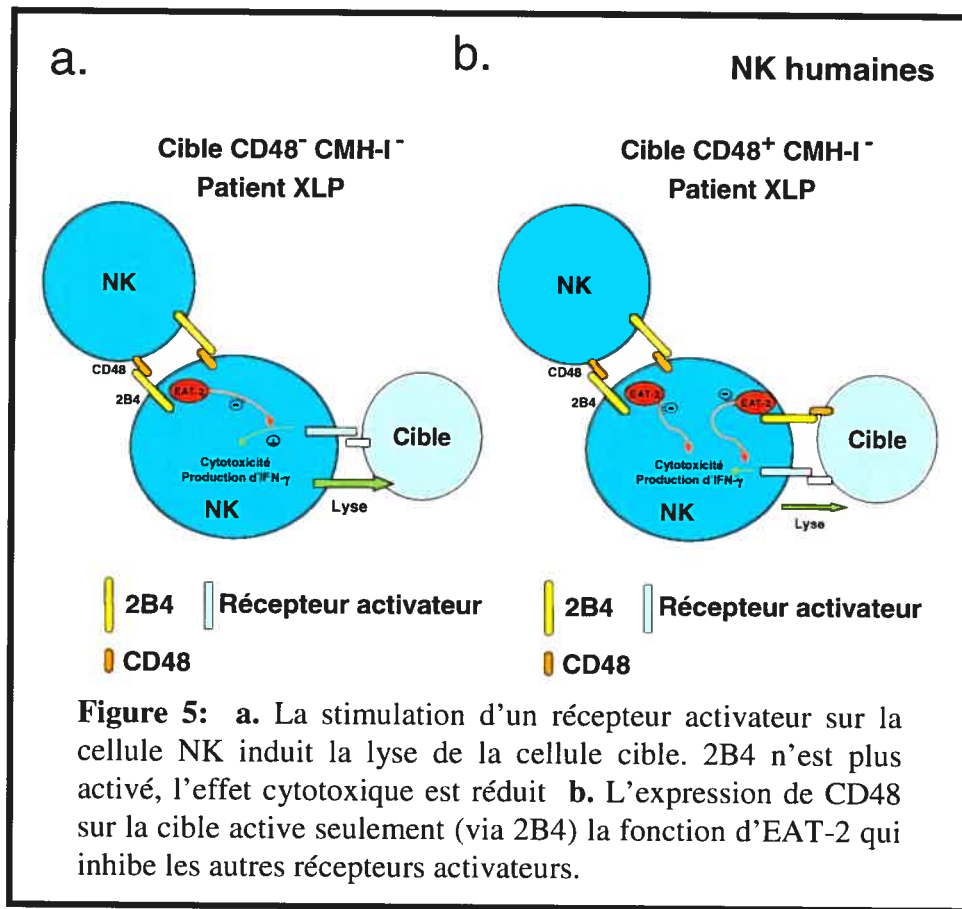
divergences mineures (Figure 3). On note ainsi le remplacement de la lysine 125 (K125) d'EAT-2 par un acide glutamique (E125) chez ERT. Ce changement engendre une modification des propriétés physico-chimiques en rendant cette région plus acide, ce qui potentiellement pourrait diminuer l'accessibilité de surface aux protéines (peut-être par répulsion due aux charges) interagissant avec les tyrosines avoisinantes (Figure 3). Il est d'ailleurs intéressant de constater qu'ERT ne génère pas tout à fait le même signal qu'EAT-2 dans les BI-141 (Chapitre II). Ces substitutions d'acides aminés dans la région carboxy-terminale entre EAT-2 et ERT pourraient expliquer des différences subtiles de fonctions entre ces deux molécules.

2. Le paradigme de 2B4

Durant de nombreuses années 2B4 fût l'un des récepteurs activateurs les plus usité pour stimuler les cellules NK. La génération de la souris déficiente pour cette molécule a relancé la question sur le véritable rôle de ce récepteur, particulièrement dans les cellules NK. Il semble de plus en plus évident que 2B4 soit capable de générer à la fois un signal activateur ou un signal inhibiteur. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette dualité.

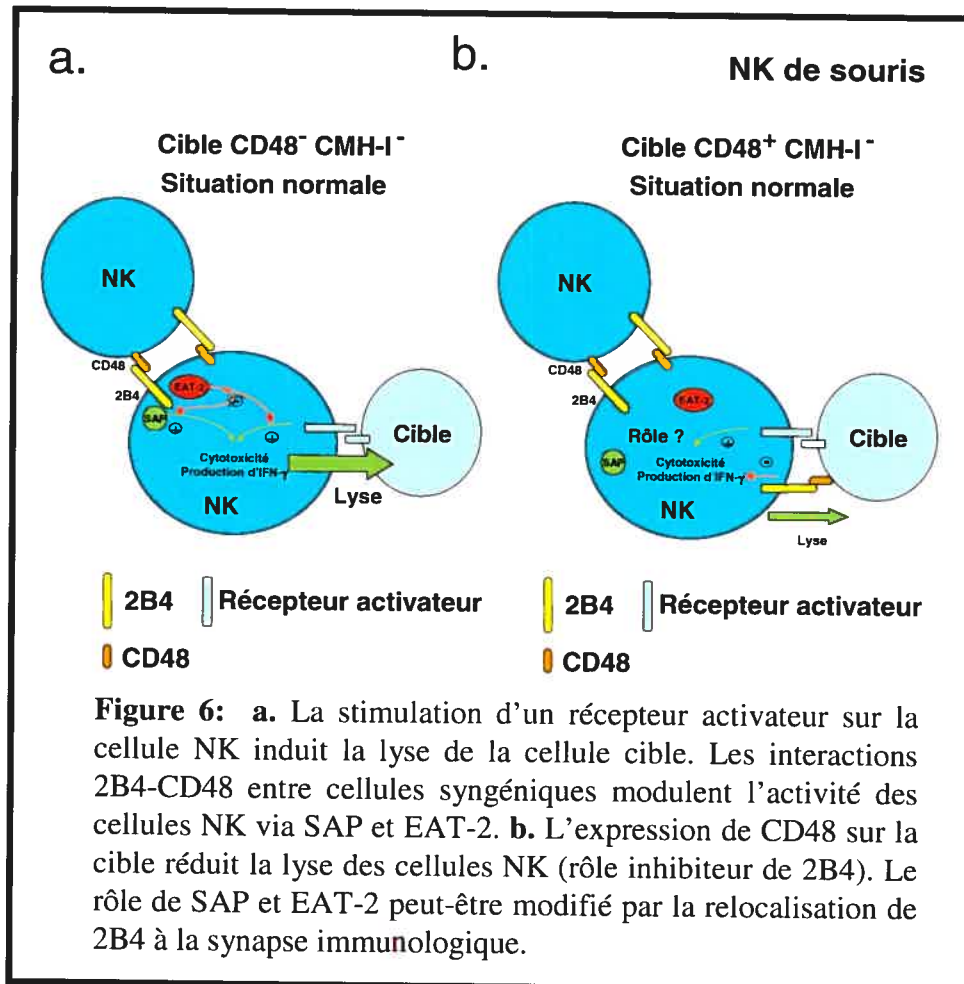


Comme de nombreuses études l'ont démontré, la fonction activatrice de 2B4 nécessite l'interaction du récepteur avec une molécule SAP fonctionnelle (186, 233). Ainsi, on note que ce soit chez les patients XLP ou les souris SAP déficientes, un défaut des cellules NK dans l'effet cytotoxique induit par 2B4 (Figures 5 et 8).



Afin de mieux comprendre le rôle de 2B4, il est nécessaire d'introduire quelques subtilités qui caractérisent cette voie de signalisation. La co-activation d'un récepteur activateur avec 2B4 chez les patients XLP induit une inhibition de ces récepteurs. Cette observation suggère donc que 2B4 induit un signal inhibiteur qui affecte des récepteurs activateurs en l'absence de SAP (205). L'autre constatation provient du phénotype obtenu chez la souris déficiente pour 2B4 qui démontre une augmentation de la cytotoxicité contre les cibles CD48⁺. Dans ce cas, la fonction dominante de 2B4 est une fonction d'inhibition qui est aussi SAP indépendante (208). Par ailleurs, nos résultats démontrent qu'EAT-2 s'associe à 2B4 et induit un signal inhibiteur via ses deux tyrosines carboxy-terminales. Ces résultats suggèrent donc fortement l'implication d'EAT-2 dans le rôle d'inhibition de 2B4. L'un des mécanismes pouvant expliquer la double fonction de 2B4 pourrait donc se justifier

par l'association sélective d'EAT-2 ou de SAP à 2B4, chacun des adaptateurs induisant respectivement soit une inhibition soit une activation dans les cellules NK. Cette hypothèse pourrait aussi corroborer avec une observation qui a été faite chez les cellules NK humaines: les cellules NK immatures, qui ont une capacité de lyse très réduite, expriment 2B4 et EAT-2 mais non pas SAP. En considérant qu'une majorité de cellules environnantes des cellules NK immatures expriment CD48, il est probable que l'interaction 2B4-CD48 n'induit, dans ce cas particulier, qu'un signal inhibiteur dépendant d'EAT-2. Ce phénomène pourrait expliquer, dans une certaine mesure, la tolérance des cellules NK durant leur différenciation et leur maturation.



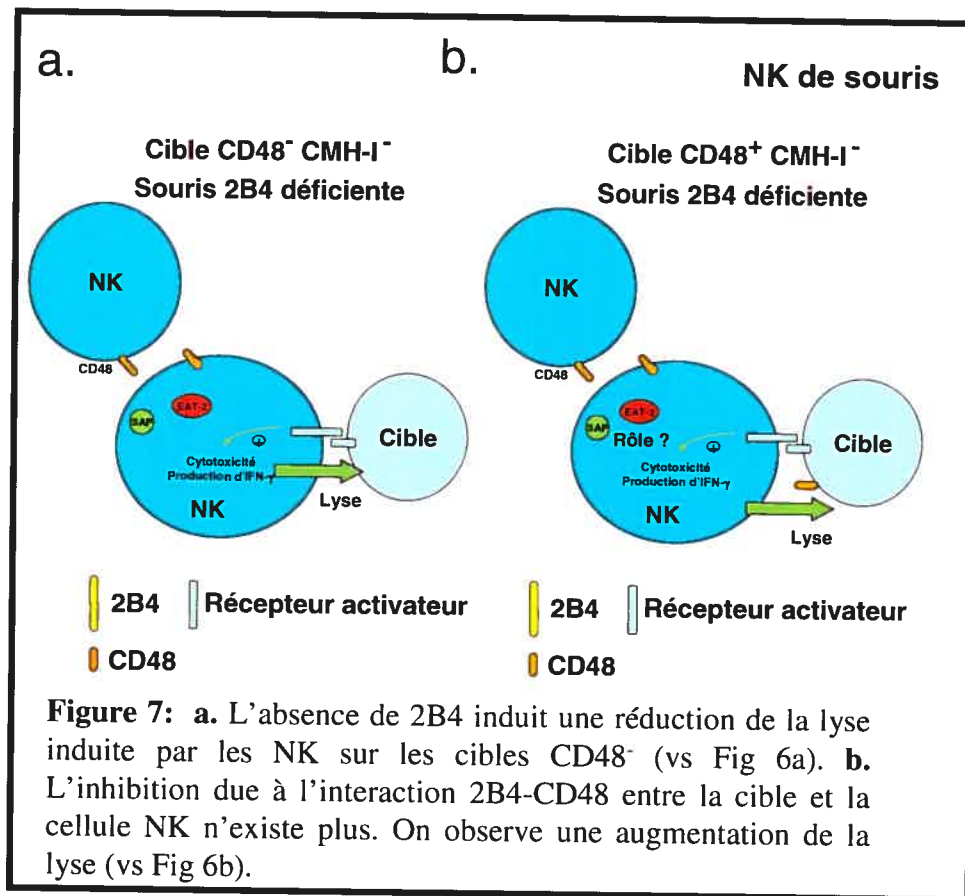
Cette dernière notion nous amène à introduire un nouveau paramètre pouvant influencer la signalisation de 2B4 : le rôle de CD48 chez l'humain et la souris.

1. Chez l'humain, dans la grande majorité des cas, l'expression de CD48 sur les cellules cibles induit une augmentation de la lyse des cellules NK (Figure 4) (201, 204). Pourtant 2B4 peut aussi exercer une activité inhibitrice (sur les autres récepteurs activateurs) chez l'humain en l'absence de SAP et en présence de cible CD48⁺ (Figure 5b). Ainsi de manière consistante, la rupture de l'interaction entre 2B4 et CD48 par des anticorps restaure une partie de l'activité cytotoxique des cellules NK de patients XLP. Il est probable que ce signal négatif implique EAT-2. On pourrait donc supposer qu'une interaction 2B4-CD48 entre NK et cellules cibles en l'absence de SAP, induit un signal négatif dépendant d'EAT-2. Pour que cette hypothèse fonctionne il faut supposer que le signal dominant induit par 2B4, soit le signal activateur SAP dépendant. L'un des problèmes concernant cette hypothèse est dû au fait qu'une majorité des cellules hématopoïétiques (incluant les NK) de l'organisme expriment CD48, pourtant les cellules NK les reconnaissent sans les lyser. Pour expliquer ce paradoxe, plusieurs alternatives sont possibles. Il faut, une fois de plus, pour les comprendre, introduire de nouveaux acteurs et paramètres au système.

La tolérance des cellules NK est en partie maintenue par les récepteurs inhibiteurs qui interagissent continuellement avec les CMH-I sur la surface des cellules environnantes. Les expériences décrivant le rôle inhibiteur de 2B4 (en l'absence de SAP) chez l'humain s'observe pour des cibles CD48⁺ et aussi HLA-I négatives. Parallèlement, la fonction activatrice de 2B4 (en présence de SAP) contre des cibles CD48⁺ est aussi dépendante de la perte du HLA-I. L'expression exclusive de CD48 sur les cibles ne suffit donc pas pour induire une augmentation de la lyse via 2B4, les cibles doivent avoir perdu le CMH-I ou encore (hypothèse non testée mais probable) exprimer des ligands pour des récepteurs activateurs. Cette observation permet d'expliquer le fait que les cellules NK ne lysent pas les autres cellules normales de l'organisme exprimant CD48.

2. Chez la souris l'analyse du rôle de CD48 ne concorde pas totalement avec le rôle de CD48 chez l'humain. L'étude de la souris déficiente pour 2B4 montre que

le signal dominant semble être un signal inhibiteur en situation de lyse avec des cibles $CD48^+$ (Figure 7). Il faut cependant noter que les cibles $CD48^-$ semblent être moins tuées par les NK de souris 2B4 déficientes (comparer figures 6a et 7a). De plus, chez la souris l'expression de CD48 sur les cellules cibles induit une résistance des cellules face aux cellules NK, qu'elles soient allogéniques ou syngéniques (Figure 6). Ceci indique un effet négatif dominant de 2B4 chez la souris. Dans ce système, CD48 peut donc agir comme un mécanisme d'induction de tolérance indépendamment du CMH-I. Ainsi, toutes les cibles testées montrant une augmentation de l'effet cytotoxique avec les NK des souris EAT-2^{-/-} sont $CD48^-$ (YB, CHO).



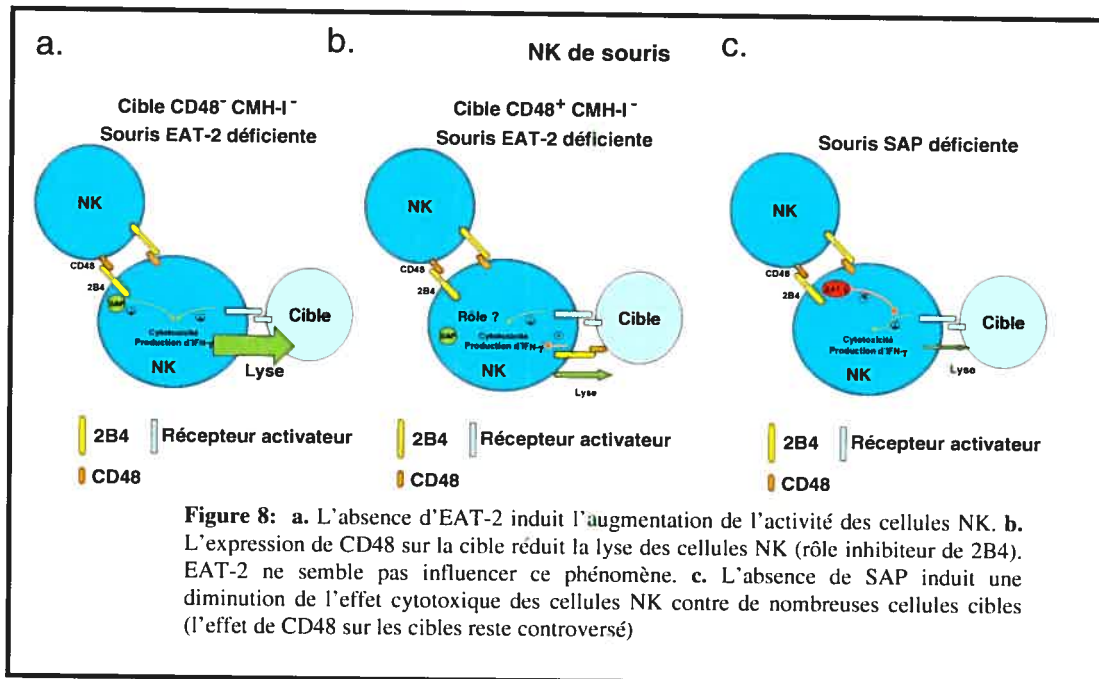
Par opposition, toutes les autres cellules qui ne présentent pas de différences sont $CD48^+$ (YAC-1, RMA, RMA-S). Ceci suggère donc que le rôle inhibiteur de

2B4 via EAT-2 est dépendant de l'expression de CD48 sur les cibles et peut-être aussi sur les NK. En d'autres termes, il est possible qu'EAT-2 induise un signal d'inhibition seulement en présence de cibles CD48⁺. Néanmoins les NK des souris SAP déficientes exhibent des défauts de lyse contre certaines cibles (56). De plus l'engagement de 2B4 par des anticorps (RADCC, anticorps immobilisés sur plaque) ou des interactions 2B4-CD48 entre NK ou entre NK et cellules T CD8⁺ semble activer les cellules NK de manière SAP dépendante.

En résumé, chez l'humain, l'expression de CD48 sur des cibles augmente la lyse des cellules seulement en situation allogénique (SAP dépendant), mais l'interaction 2B4-CD48 pourrait aussi générer un signal négatif via EAT-2 en l'absence de SAP. Chez la souris, l'expression de CD48 sur les cibles diminue la lyse des cellules en situation allogénique ou syngénique. EAT-2 et SAP induisent des signaux différents en fonction des cibles et aussi peut-être en fonction de l'expression de CD48 sur ces cibles.

D'autres considérations pourraient expliquer non seulement les différents résultats obtenus chez l'humain et la souris mais aussi le double rôle de 2B4. Notons que 2B4 existe sous deux isoformes chez la souris mais pas chez l'humain (voir Chapitre I). Il est probable qu'une modulation plus fine l'expression de l'un ou de l'autre des isoformes chez la souris génère des signaux différents. Cette régulation est peut-être absente chez l'humain. La localisation spatiale du récepteur 2B4 de même que celle des adaptateurs SAP, EAT-2 et ERT est aussi à considérer. L'interaction entre cellules NK et cellules cibles est dépendante de ce que l'on appelle les synapses immunologiques. Ainsi, la reconnaissance des récepteurs (NK)-ligands (cible) se fait à la surface de la membrane plasmique dans des zones riches en lipides dites des radeaux lipidiques. L'ensemble comprenant les récepteurs et les effecteurs dans cette zone, forme la synapse immunologique. Cette région constitue un endroit privilégié pour l'activation des kinases et des interactions protéines-protéines ou lipides-protéines. La relocalisation probable de 2B4 dans la synapse lors de l'interaction avec une cellule cible pourrait modifier la signalisation du récepteur. On peut aussi considérer que les adaptateurs EAT-2 et SAP ne sont pas distribués de manière

uniforme dans le cytoplasme, et la relocalisation de 2B4 pourrait favoriser l'une ou l'autre des associations. Par ailleurs, le rôle inhibiteur de 2B4 a une action directe sur les autres récepteurs activateurs impliqués dans la lyse des cellules cibles ou la production de cytokines. Il est donc vraisemblable que 2B4 doit se retrouver à proximité de ces récepteurs, et par conséquent dans la synapse.



3. EAT-2 et autres récepteurs de la famille SLAM

EAT-2 peut probablement s'associer à des SRR autres que SLAM ou 2B4. Morra et collègues ont montré des associations d'EAT-2 avec CD84 et Ly9 de façon Src kinase dépendante (192). Une autre étude a montré qu'EAT-2 pouvait interagir avec CD84 dans les cellules B (234). Ces observations n'ont pas été réalisées avec des cellules primaires ou avec des protéines endogènes laissant planer certaines incertitudes sur la réalité physiologique de ces interactions. Plus récemment, deux groupes ont étudié EAT-2 dans les cellules humaines. La première étude montre qu'EAT-2 peut s'associer à NTB-A dans les cellules NK humaines et que cette interaction contrôlerait positivement l'effet cytotoxique (206). L'autre étude suggère qu'EAT-2 pourrait s'associer à CRACC (à la différence de SAP) dans les cellules NK humaines (235). Cette interaction provoquerait non seulement la phosphorylation du récepteur mais aussi d'effecteurs intracellulaires tels que PLC γ 1, PLC γ 2 et la PI3-Kinase. Bien que la stimulation de CRACC induise une augmentation de l'effet cytotoxique des cellules NK, l'évidence pouvant relier cette fonction physiologique à l'association du récepteur à EAT-2 n'ont pas été formellement établie. Nous n'avons pas détecté d'association d'EAT-2 à CRACC dans les NK de souris (Chapitre III). Pour que cette association survienne chez la souris, Il est possible qu'un facteur supplémentaire autre que l'interaction homotypique CRACC-CRACC soit requis (co-stimulation avec un autre récepteur).

EAT-2 pourrait générer des signaux intracellulaires distincts selon les récepteurs auxquels il est associé. Dans ce contexte il est probable que la fonction d'EAT-2 ne soit pas seulement dépendante du récepteur, mais aussi de la localisation cellulaire et du niveau d'expression de ces récepteurs. En approfondissant cette idée, on pourrait considérer qu'il existe d'autres types de signaux intracellulaires dépendants de ces récepteurs et des adaptateurs mais survenant de manière différente. En effet, ces récepteurs sont activés par homo-dimérisation lors d'un contact cellule à cellule, cette interaction est donc en *trans*. On peut imaginer que

l'activation de ces récepteurs puisse aussi de faire en *cis* dans une même cellule et produire ainsi un autre type de signal. Ce type de mécanisme a d'ailleurs déjà été observé pour d'autres classes de récepteurs tels que les Ly49 dans les cellules NK (236, 237). Une autre possibilité de signal pourrait survenir dans le réticulum endoplasmique (RE). En effet, la partie intracellulaire des récepteurs est exposée dans le cytoplasme et donc disponible pour une association aux adaptateurs de la famille SAP. Il est donc possible qu'une interaction de ces récepteurs au sein même du RE puisse générer un signal intracellulaire.

Finalement, il n'est pas exclu que les adaptateurs de la famille SAP possèdent des fonctions indépendantes des récepteurs de la famille SLAM. En effet, ces adaptateurs possèdent un domaine SH2, et pour EAT-2/ERT des tyrosines capables d'être phosphorylées très attractives, ce qui en font de bons partenaires potentiels pour de nombreuses protéines.

4. Perspectives futures

Le travail présenté dans cette thèse amène de nombreuses questions quant à la suite des études sur les adaptateurs de la famille SAP. Plusieurs avenues peuvent être empruntées pour poursuivre ces études.

L'une des questions essentielles à analyser est évidemment le mécanisme par lequel EAT-2/ERT sont capables d'inhiber la fonction des cellules NK. Plusieurs approches peuvent être entreprises pour déterminer ce mécanisme. L'une d'elle est de rechercher les protéines potentiellement capables de s'associer à EAT-2/ERT. L'utilisation de la spectrométrie de masse pourrait apporter des réponses à cette question. Parallèlement, il serait judicieux de tester les possibles interactions entre les tyrosines carboxy-terminales d'EAT-2/ERT et différents domaines SH2 en utilisant des approches de biochimie *in vitro* (GST-pull down). Les candidats découverts et sélectionnés par ces méthodes devront être testés par la suite dans des expériences plus physiologiques. Parmi ces candidats, il est par exemple possible que l'on identifie des phosphatases ou des ubiquitines ligases. Une étape d'analyse *in vivo* de la voie de signalisation 2B4-EAT-2 dans les cellules NK déficientes pour certains de ces candidats (s'ils ont disponibles) apparaîtrait alors essentielle. Par ailleurs, la surexpression dans des lignées cellulaires ou par la génération de souris transgéniques pour ces candidats confirmerait leur implication dans le signal négatif induit par EAT-2. Une autre approche consisterait à émettre l'hypothèse qu'EAT-2 modifie des voies de régulation transcriptionnelle, et induit donc l'expression de protéines inhibitrices. Pour tester cette idée, il serait approprié d'observer des variations d'expression d'ARNm par MicroArrays entre des cellules NK issus de souris EAT-2^{+/+} ou EAT-2^{-/-}.

L'une des questions importantes discutée dans la discussion se rapportait à la différence probable de fonction entre EAT-2 et ERT et leur relation à la protéine EAT-2 humaine. Afin de déterminer s'il existe réellement une redondance entre EAT-2 et ERT chez la souris, il serait adéquat de générer une souris double déficiente pour EAT-2 et ERT. Dans le même ordre d'idée, et en considérant que le patron

d'expression cellulaire d'EAT-2 (cellules dendritiques, NK, macrophages) est moins restreint que celui d'ERT (NK), il serait intéressant de considérer la génération de souris EAT-2 ou ERT déficientes tissus spécifiques en utilisant des promoteurs appropriés. Dans les deux cas, l'analyse de ces souris révélerait probablement les spécificités fonctionnelles de chacun des adaptateurs.

Malgré les nombreuses études qui couvrent le point concernant le rôle de 2B4 et CD48 dans les cellules NK, la controverse subsiste. Quelques analyses simples pourraient venir enrichir et clarifier ce domaine. De nombreuses études ont essayé de bloquer l'interaction entre 2B4 et CD48 en utilisant des anticorps. Bien que cette approche semble correcte, elle se heurte au fait que de nombreuses expériences favorisant cette méthode utilisent des anticorps intacts (portions Fc+Fab), et donc susceptibles d'activer le récepteur FcγRIII des cellules NK. La génération d'anticorps F(ab')₂ bloquant contre CD48 ou 2B4 pourrait facilement résoudre ce problème. Il serait par ailleurs intéressant de tester des cibles (cellules) CD48 positives ou négatives contre des cellules NK déficientes pour les différents adaptateurs de la famille SAP. La création d'une souris CD48 déficiente serait un atout supplémentaire dans l'élucidation du rôle de CD48 dans la signalisation impliquant 2B4. Plusieurs expériences peuvent être réalisées grâce à ces souris : d'une part tester la capacité de lyse et de production des cellules NK CD48^{-/-} et d'autre part utiliser des cellules issue de ces souris comme cibles pour des NK sauvages ou déficientes pour les adaptateurs de la famille SAP. Par ailleurs, en considérant l'hypothèse selon laquelle CD48 pourrait jouer un rôle dans la tolérance indépendante du CMH-I, il pourrait se révéler important de rendre les cibles (cellules) CD48^{-/-} plus ou moins susceptibles face à la lyse des cellules NK. Plusieurs méthodes peuvent être employées, telles que la transfection de ces cellules avec des ligands pour des récepteurs activateurs (par exemple pour NKG2D), ou encore en croisant ces souris avec des souris déficientes pour le CMH-I (création de souris CD48^{-/-}β2m^{-/-}).

L'un des derniers points à mentionner est évidemment l'intérêt thérapeutique que représente EAT-2 dans les infections virales ou le cancer. La recherche de molécules capables de réguler négativement EAT-2 pourrait permettre d'activer les

cellules NK face à certaines maladies. Les cibles évidentes pour une telle inhibition sont évidemment les tyrosines carboxy-terminales d'EAT-2 qui définissent la spécificité de la molécule, et par là même limite les risques d'interactions croisées. Dans cette perspective une étroite interaction devrait être envisagée entre des chimistes et des biologistes pour définir et caractériser de telles molécules.

5. Conclusions

Au cours de ces dernières années, l'étude des voies de signalisation a démontré la fonction cruciale que jouent les adaptateurs au sein de la cellule. Les cellules immunitaires intègrent par une multitude de réponses les signaux reçus par le milieu extérieur. Les associations sélectives des adaptateurs régissent et organisent ces réponses. Le cas des adaptateurs de la famille SAP illustre parfaitement ces phénomènes en délivrant des signaux différents ou dans certains cas opposés dans les cellules NK. Les mécanismes régissant leurs associations à d'autres molécules déterminent leurs spécificités propres. Ainsi, les premières observations que nous avons réalisées dans les cellules NK suggèrent que ces adaptateurs ont un rôle majeur dans la régulation des cellules immunitaires. Ces adaptateurs étant exprimés dans d'autres types cellulaires, il est probable qu'ils soient aussi impliqués dans d'autres voies de signalisation. Il reste donc de nombreuses expériences à réaliser pour comprendre clairement le fonctionnement de ces petites molécules.

ANNEXES

Présentation de l'article publié dans Nature Cell Biology. 2003 Feb;5(2):149-54.

**Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain: a novel
mechanism of receptor signalling in immune regulation**

Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain : a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation

Sylvain Latour^{1,2}, Romain Roncagalli^{1,3}, Riyan Chen¹, Marcin Bakinowski¹, Xiaochu Shi¹, Pamela L. Schwartzberg⁴, Dominique Davidson¹ and André Veillette^{1,3,5-8*}

From the Laboratory of Molecular Oncology¹, IRCM, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7; Unité INSERM U429², Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France; Program in Molecular Biology³ and Department of Medicine⁵, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7; National Human Genome Research Institute⁴, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA 20892; Departments of Biochemistry⁶, Microbiology and Immunology⁷, and Medicine⁸, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3G 1Y6

Key words: SAP, SH2D1A, XLP, Fyn, SLAM, SH2 domain, SH3 domain

SAP (or SH2D1A), an adaptor-like molecule expressed in immune cells, is composed almost exclusively of a Src homology 2 (SH2) domain¹⁻⁴. In humans, SAP is mutated and either absent or non-functional in X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome, a disease characterized by an inappropriate response to Epstein-Barr virus (EBV) infection⁵. The SAP protein associates through its SH2 domain with tyrosines in the cytoplasmic domain of members of the SLAM family of immune cell receptors, and is absolutely required for the function of these receptors^{1,6-10}. This property results from the ability of SAP to promote the selective recruitment and activation of FynT, a cytoplasmic Src-related protein tyrosine kinase (PTK)⁸. Here we demonstrate that SAP operates in this pathway by binding to the Src homology 3 (SH3) domain of FynT, through a second region in the SAP SH2 domain distinct from the phosphotyrosine-binding motif. We reveal that this interaction is essential for SAP-mediated signalling in T-cells, and for the capacity of SAP to modulate immune cell function. These observations characterize a novel and biologically important signalling mechanism, in which an adaptor molecule composed only of an SH2 domain links a receptor devoid of intrinsic catalytic activity to the kinase required for its function.

Previously, we reported that SAP was absolutely required for SLAM-mediated signalling in a T-cell line, as a result of the capacity of SAP to promote recruitment of the Src-related PTK FynT, but not of its relative Lck⁸. To address whether a similar mechanism occurs in normal T-cells, the ability of SLAM to associate with FynT was examined in T-cells from normal and SAP-deficient

mice^{11,12} (**Fig. 1**). In thymocytes isolated from SAP⁺ mice (**Fig. 1a**, lanes 1 and 2), SLAM was tyrosine phosphorylated (second panel), and was associated both with SAP (first panel) and with FynT (third panel). These interactions, as well as SLAM tyrosine phosphorylation, were already present in unstimulated thymocytes (lane 1), and were only minimally enhanced by exogenous stimulation with anti-SLAM antibodies (lane 2). This constitutive signalling was presumably due to prior engagement of SLAM in vivo, as a result of homotypic interactions between SLAM molecules on adjacent thymic cells⁸. In T-cells from SAP⁻ mice (lanes 3 and 4), however, SLAM was not tyrosine phosphorylated (second panel) and failed to associate with FynT (third panel). These data showed that SAP is absolutely required for the interaction between SLAM and FynT, as well as for SLAM tyrosine phosphorylation, in normal T-cells.

Since SAP is composed almost exclusively of an SH2 domain, it was not obvious how it could bind to SLAM on the one hand and promote recruitment of FynT on the other hand. To address this issue, we assessed which domain(s) of FynT was(were) involved in mediating its recruitment to the SLAM-SAP complex. For this, glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins encompassing the FynT SH2 or SH3 domain were tested for their ability to interact with SLAM in vitro, in the presence or in the absence of SAP (**Fig. 2a**). As reported elsewhere⁸, the FynT SH2 domain (lane 8) was able to interact with SLAM in lysates from a T-cell line expressing SLAM and SAP, albeit rather weakly in comparison to the SH2 domain of SAP (lane 4) or SHIP (lane 6), a 5' inositol phosphatase involved in SLAM signalling^{8,13}. Surprisingly, the FynT SH3 domain (lane 10) interacted much more

extensively with SLAM, and this association was strictly dependent on SAP expression. Note that the SAP SH2 domain (lane 3) also associated well with SLAM molecules derived from cells lacking SAP, in which SLAM is devoid of tyrosine phosphorylation⁸. This observation was keeping with the previous finding that the SLAM-SAP association can occur in a phosphotyrosine-independent fashion^{1,8}.

Next, we tested whether the FynT SH3 domain was interacting with SLAM or SAP, using lysates from T-cell lines expressing SLAM alone, SAP alone or both (**Fig. 2b**). This study indicated that the SH3 domain of FynT actually associated with SAP (lane 3), and not SLAM (lane 2). The association was highly specific, since several other SH3 domains (**Figs. 2c** and **d**) failed to bind SAP. These included the SH3 domain of other Src-related protein tyrosine kinases (PTKs) like Lck, c-Fgr, Lyn, Hck, c-Yes and c-Src. A similar interaction between SAP and the FynT SH3 domain was noted for human SAP (data not shown).

In order to demonstrate whether the interaction between SAP and the FynT SH3 domain was direct, we studied the ability of bacterially-produced versions of these two proteins to interact in vitro (**Fig. 2e**). This experiment revealed that a fusion protein encompassing full-length SAP (GST-SAP) (top panel) associated with a TrpE fusion bearing the FynT SH3 domain (lane 2). No association was detected between GST-SAP and the Lck SH3 domain (lane 3), in agreement with the previous finding that FynT, but not Lck, was recruited to the SLAM-SAP complex. To assess whether conventional residues in the FynT SH3 domain were involved in this association, we examined the ability of wild-type SAP to associate with a FynT SH3 domain mutated at a highly conserved proline (proline 134-to-leucine 134 mutation). This residue is

critical for typical SH3 domain-mediated interactions (**Fig. 2f**)¹⁴. This analysis showed that mutation of proline 134 (lanes 5-8) drastically reduced the capacity of the FynT SH3 domain to bind to wild-type SAP. Hence, it is likely that typical residues in the FynT SH3 domain were responsible for mediating the association with SAP. Lastly, we wanted to establish that the FynT SH3 domain was required to recruit FynT to the SLAM-SAP complex. Using co-transfection assays in Cos-1 cells (**Fig. 2g**), it was shown that full-length FynT was co-immunoprecipitated with a chimera bearing the cytoplasmic domain of SLAM (Tac-SLAM) in the presence of SAP (lane 4), but not in the absence of SAP (lane 3). Importantly, removal of the FynT SH3 domain (lane 6), but not the FynT SH2 domain (lane 8), abolished this interaction.

SAP is composed of an SH2 domain, in addition to a short carboxyl-terminal extension of undetermined function^{4,5}. To investigate which region of SAP was responsible for binding to the FynT SH3 domain, we took advantage of a series of FLAG epitope-tagged chimeras created between SAP and its relative EAT-2 (**Fig. 3a**)¹⁵. Our preliminary studies indicated that, unlike SAP, EAT-2 did not interact with the FynT SH3 domain (our unpublished results). The various chimeras were expressed in HeLa cells and tested for their capacity to bind the FynT SH3 domain in vitro (**Figs. 3b and c**). These studies showed that the site of interaction for the FynT SH3 region was located between amino acids 67 to 92 of SAP. These residues are positioned within the SAP SH2 domain¹⁶⁻¹⁸. In order to delineate further the site, an alanine mutagenesis scan was performed for each of the residues lying between amino acids 67-92 (**Fig. 3d** and data not shown). An example of the results obtained

is shown in **Fig. 3d**. These experiments revealed that seven residues of SAP (arginine 75, phenylalanine 76, phenylalanine 77, arginine 78, valine 80, lysine 81 and asparagine 82) were critical for binding to the FynT SH3 domain (**Fig. 3f**). Mutation of any of these amino acids caused a greater than 90% reduction of the association. All other residues in this region were dispensable. The residues in the SAP SH2 domain involved in the interaction with the FynT SH3 domain were distinct from those allowing binding to phosphotyrosine-containing peptides. In particular, substitution of threonine 68 by isoleucine (T68I), a natural mutation found in XLP that drastically reduces the phosphotyrosine-binding activity of SAP^{1,18}, had no consequence on the association with the FynT SH3 domain (**Fig. 3d**, lane 2). Moreover, mutation of a conserved arginine essential for phosphotyrosine-binding (arginine 32 of SAP) caused no diminution of the interaction with the FynT SH3 domain (**Fig. 3e**, lane 3). Similar results were obtained for human SAP (data not shown).

The functional significance of this interaction was next examined. For this purpose, we generated stable transfectants of the mouse T-cell line BI-141 expressing SLAM alone, or in combination with wild-type SAP or arginine 78-to-alanine 78 (R78A) SAP (**Fig. 4a**). This last mutation was chosen because it completely abrogated the ability of SAP to bind the FynT SH3 domain in vitro, without altering any of the residues participating in the phosphotyrosine-binding fold of the SAP SH2 domain¹⁶⁻¹⁸. All cells expressed equivalent amounts of SLAM and, where appropriate, SAP (**Fig. 4a**). As expected, SAP R78A (**Fig. 4b**, first panel, lanes 3 and 4) was able to associate with SLAM in a manner analogous to wild-type SAP (lane

2). Nonetheless, unlike wild-type SAP (lane 2), it failed to mediate recruitment of FynT to SLAM (second panel, lanes 3 and 4), and it was unable to activate FynT (third panel, lanes 3 and 4).

The ability to SAP R78A to mediate SLAM signalling was subsequently studied (**Fig. 4c**). In accordance with a previous report⁸, expression of SLAM and wild-type SAP (**Fig. 4c**, lane 2), but not SLAM alone (lane 1), induced the tyrosine phosphorylation of several substrates in BI-141 cells, including the 5' inositol phosphatase SHIP and the adaptor molecules Dok-1 and Dok-2. Extensive tyrosine phosphorylation of SLAM was also detected. The combination of SLAM and wild-type SAP is able to induce constitutive protein tyrosine phosphorylation in these cells by a mechanism presumably analogous to that suggested above for thymocytes. In contrast to wild-type SAP (lane 2), SAP R78A (lanes 3 and 4) was unable to promote SLAM-mediated tyrosine phosphorylation of SHIP, Dok-1 or Dok-2. These findings were confirmed by immunoprecipitation with specific antibodies directed against these various substrates (**Fig. 4d**). Even though SAP R78A was unable to promote tyrosine phosphorylation of SHIP and Dok-related adaptors, it was still capable of inducing partial tyrosine phosphorylation of SLAM itself (**Fig. 4c**, lanes 3 and 4; data not shown). While the precise basis for this phenomenon is not known, it may result from the aptitude of the SAP SH2 domain to protect SLAM from the action of cellular protein tyrosine phosphatases. Similar observations have been made for other SH2 domains^{19,20}.

To evaluate the biological significance of the SAP-FynT interaction, the influence of SAP R78A on antigen receptor-mediated cytokine production was ascertained (**Fig. 5**). In agreement with our earlier report⁸, expression of wild-type SAP and SLAM in BI-141 cells resulted in an inhibition of interferon (IFN)- γ secretion (**Fig. 5b**), but not interleukin (IL)-2 production (**Fig. 5a**), in response to anti-CD3 monoclonal antibody (MAb) stimulation. By opposition, co-expression of SAP R78A and SLAM had no effect. Therefore, unlike wild-type SAP, SAP R78A was unable to modulate cytokine production in the presence of SLAM in activated BI-141 cells.

We also tested the impact of expression of wild-type SAP or SAP R78A in normal T-cells (**Figs. 5c-e**). Transgenic mice overexpressing these two SAP proteins in T-cells were created, using a CD2 promoter-driven construct. T-cells isolated from these animals overexpressed equally well the SAP protein, when compared with cells purified from control littermates (**Fig. 5c**). While thymocyte development was normal in these mice (data not shown), mature T-cell responses were affected. In keeping with the results obtained with SAP-deficient mice^{11,12}, anti-CD3 MAb-stimulated T-cells from mice overexpressing wild-type SAP demonstrated an increase in IL-4 production, as well as a small albeit reproducible decrease in IFN- γ secretion (**Figs. 5d and 5e**). Opposite changes were observed in SAP-deficient mice^{11,12}. Contrary to mice overexpressing wild-type SAP, though, no change in the profile of cytokine production was noticeable in T-cells from mice expressing SAP R78A (**Figs. 5d and 5e**).

We have identified a signalling mechanism in which a small molecule composed in essence only of an SH2 domain (SAP) can mediate a critical biological signal, by directly linking a cell surface receptor (SLAM) to a Src-related PTK (FynT). While SH2 domains are usually viewed as phosphotyrosine-binding domains, the SAP SH2 domain carries an additional binding surface that is highly specific for the SH3 domain of FynT. This site is a non-proline-based sequence (RFFRxVKN), and is positioned between the sixth β sheet (β F) and the second α helix (α 2) of the SAP SH2 domain. Based on the structure of the SAP SH2 domain¹⁶⁻¹⁸, this region is foreseen to be located on the external surface of the SH2 domain, away from the phosphotyrosine-binding pocket that interacts with the SLAM-related receptors (**Fig. 3g**). Hence, by being able to interact simultaneously with SLAM and FynT through two distinct surfaces, the SAP SH2 domain efficiently and specifically links SLAM to the PTK responsible for its signalling mechanism⁸.

Several lines of evidence indicate that this mechanism is critical for normal immune function. First, we found that the ability of SLAM to recruit FynT and become tyrosine phosphorylated was lost in SAP-deficient mice, which are known to exhibit an immune dysfunction. Second, a mutant SAP protein (SAP R78A), which preserved the ability to bind SLAM but lost the capacity to recruit and activate FynT, was unable to promote SLAM-mediated protein tyrosine phosphorylation in a T-cell line. And third, this mutant was also incapable of modulating cytokine production in a T-cell line, as well as in normal mouse T-cells. On the basis of these findings, we propose that SAP-mediated recruitment of FynT is a key step in the function of

SLAM-related receptors, and that it is necessary for the ability of these receptors to modulate immune functions. This signalling mechanism is probably operational not only in T-cells, but also in other immune cells, including natural killer cells which co-express SAP and FynT^{4,5}. Finally, since human SAP binds to the FynT SH3 domain in a way similar to mouse SAP (data not shown), a defect in this signalling mechanism is likely involved in the abnormal immune function of XLP patients.

It was previously shown that engagement of the SH3 domain provides an efficient and potent means of activating Src kinases^{14,21,22}. Most notably, it was reported that binding of the human immunodeficiency virus Nef protein to the SH3 domain of Hck provided an efficient way of stimulating the kinase activity of Hck¹⁴. However, the pertinence of this mechanism to normal cellular signalling has not been demonstrated. In this context, the demonstration that SAP activates FynT by binding to its SH3 domain, provides a clear example that this mode of activation occurs in physiological signalling mechanisms.

As a corollary to our findings, it is reasonable to propose that other SH2 domains may interact with SH3 domains, thus linking the components of other signal transduction pathways. Furthermore, since SH2 and SH3 domains frequently co-exist in the same molecule, this type of association could be involved in intramolecular regulation. In keeping with this possibility, an intramolecular interaction was described between the SH2 and SH3 domains of the adaptor Crk²³. While the functional significance of this association was not established, it may negatively regulate the function of Crk by blocking interactions with other proteins. Therefore,

interactions between SH2 and SH3 domains may be used broadly to regulate signalling in mammalian cells.

In summary, we have described a novel signalling mechanism by which SAP, a small adaptor composed almost only of an SH2 domain, is able to link physically and functionally certain immune cell receptors to the Src-related PTK FynT. Our studies show that this function relates to the ability of the SAP SH2 domain to interact via two distinct regions with SLAM receptors on the one hand, and with the SH3 domain of FynT on the other hand. We also provide evidence that this mechanism is required for the ability of SAP to mediate signalling through SLAM-related receptors and to regulate immune cell functions. It is likely that a defect in this mechanism explains in significant part the immune defects observed in XLP.

REFERENCES

1. Sayos, J. *et al.* The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462-469 (1998).
2. Coffey, A. J. *et al.* Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat.Genet.* **20**, 129-135 (1998).
3. Nichols, K. E. *et al.* Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13765-13770 (1998).
4. Veillette, A. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci.STKE*. **2002**, E8 (2002).
5. Morra, M. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu.Rev.Immunol.* **19**, 657-682 (2001).
6. Parolini, S. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp.Med.* **192**, 337-346 (2000).
7. Bottino, C. *et al.* NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp.Med.* **194**, 235-246 (2001).
8. Latour, S. *et al.* Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* **2**, 681-690 (2001).
9. Tangye, S. G., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Nichols, K. E. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol.* **165**, 2932-2936 (2000).
10. Tangye, S. G. *et al.* Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol.* **162**, 6981-6985 (1999).
11. Wu, C. *et al.* SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat.Immunol.* **2**, 410-414 (2001).

12. Czar, M. J. *et al.* Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 7449-7454 (2001).
13. Mikhalap, S. V. *et al.* CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *J Immunol* **162**, 5719-5727 (1999).
14. Sicheri, F. & Kuriyan, J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **7**, 777-785 (1997).
15. Thompson, A. D. *et al.* EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* **13**, 2649-2658 (1996).
16. Poy, F. *et al.* Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol Cell* **4**, 555-561 (1999).
17. Li, S. C. *et al.* Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr.Biol* **9**, 1355-1362 (1999).
18. Hwang, P. M. *et al.* A "three-pronged" binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome. *EMBO J* **21**, 314-323 (2002).
19. Rotin, D. *et al.* SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor: identification of Tyr992 as the high-affinity binding site for SH2 domains of phospholipase C gamma. *EMBO J.* **11**, 559-567 (1992).
20. Yu, J. *et al.* Synergistic regulation of immunoreceptor signaling by slp-76-related adaptor clnk and serine/threonine protein kinase hpk-1. *Mol.Cell Biol* **21**, 6102-6112 (2001).
21. Moarefi, I. *et al.* Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**, 650-653 (1997).
22. Lerner, E. C. & Smithgall, T. E. SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat Struct.Biol* **9**, 365-369 (2002).
23. Anafi, M., Rosen, M. K., Gish, G. D., Kay, L. E., & Pawson, T. A potential SH3 domain-binding site in the Crk SH2 domain. *J Biol Chem* **271**, 21365-21374 (1996).

24. Abraham, N., Miceli, M. C., Parnes, J. R., & Veillette, A. Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Nature* **350**, 62-66 (1991).
25. Latour, S., Fournel, M., & Veillette, A. Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 4434-4441 (1997).
26. Davidson, D., Chow, L. M., Fournel, M., & Veillette, A. Differential regulation of T cell antigen responsiveness by isoforms of the src-related tyrosine protein kinase p59fyn. *J Exp Med* **175**, 1483-1492 (1992).
27. Cloutier, J. F. & Veillette, A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* **189**, 111-121 (1999).
28. Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N., & Veillette, A. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* **275**, 21596-21604 (2000).
29. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., & Bolen, J. B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-308 (1988).

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from the CANVAC National Centre of Excellence, the National Cancer Institute of Canada and the Canadian Institutes of Health Research (to A.V.), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France) (to S.L.). S.L. held a Fellowship from the Medical Research Council of Canada. He is now a Scientist from the Centre National de la Recherche Scientifique (France). A.V. is a Senior Investigator of the Canadian Institutes of Health Research and holds a Canada Research Chair.

METHODS.

Cells. BI-141 is an antigen-specific mouse T-cell line²⁴. Derivatives stably expressing SLAM alone, SAP alone or SLAM and SAP were described previously⁸. Clones expressing SLAM and SAP R78A were generated according to a standard protocol²⁵. Expression of SLAM and SAP was verified by immunoblot (for SLAM and SAP) and flow cytometry (for SLAM). All cells expressed equivalent amounts of TCR, CD3 and CD45 (data not shown).

cDNAs, constructs and site-directed mutagenesis. cDNAs encoding wild-type SAP, SLAM and Tac-SLAM were reported elsewhere⁸. A mouse *eat-2* cDNA was generated by RT-PCR. FLAG epitope-tagged versions of the *sap* and *eat-2* cDNAs, as well as various chimeras between *sap* and *eat-2*, were created by PCR. Point mutations were introduced using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla, CA). Variants of mouse FynT carrying a Myc-derived epitope at the carboxyl-terminus (in lieu of the carboxyl-terminal inhibitory domain) were created by PCR. Additional deletions of the SH3 domain or SH2 domain were also produced by PCR. Constructs coding for GST fusion proteins encompassing various SH2 and SH3 domains were reported elsewhere⁸ or were created as needed. The cDNA encoding the FynT mutant in which proline 134 was replaced by leucine was provided by Dr. Stéphane Richard, McGill University (Montréal, Canada). DNA constructs for the production of TrpE fusion proteins bearing the SH3 domain of FynT or Lck were produced by PCR. All cDNAs were fully sequenced to ensure that they carried no unwanted mutations (data not shown).

Antibodies. Antibodies directed against SAP, SLAM, FynT, SHIP, Dok-1, Dok-2, phosphorylated Y417 of FynT, phosphotyrosine, FLAG (MAb M2), Myc (MAb 9E10), Tac (MAb 7G7), TrpE (MAb Ab-1) and GST were described in other publications^{8,26}.

Mice. SAP-deficient mice were reported elsewhere¹². As the *sap* gene is X-linked, wild-type mice (denoted as SAP⁺ in the text and Figures) were either ^{+/+} or ⁺, whereas SAP-deficient mice (denoted as SAP⁻) were either ^{-/-} or ⁻. To produce SAP transgenic mice, full-length mouse cDNAs coding for wild-type SAP or SAP R78A were inserted in a CD2 promoter-driven construct (provided by Dr. Dimitri Kioussis, London, England). Transgenic mice expressing these constructs were then created according to standard procedures. Progenies from at least two independent founders for each type of transgenic mouse were analyzed (data not shown).

Cell stimulation. Mouse thymocytes (6.25×10^7 /ml) were incubated for 30 minutes on ice with rat anti-SLAM MAb 12F12 (25 μ g/ml). After eliminating the free unbound antibodies, cells were stimulated for 5 minutes at 37°C with rabbit anti-rat (RAR) IgG. Unstimulated cells were treated in the same manner, with the exception that were kept at 4°C. After lysis in 2X lysis buffer, SLAM was immunoprecipitated by addition of formalin-fixed *Staphylococcus aureus* (Calbiochem-Novobiochem Co., San Diego, CA).

In vitro binding assays. Binding assays using GST fusion proteins were performed as outlined previously⁸, using lysates from transfected mammalian cells or from bacteria expressing TrpE fusion proteins.

Transient transfections. Cos-1 cells were transiently transfected as described elsewhere²⁷, using Lipofectamine Plus (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). HeLa cells were infected with vaccinia virus encoding the T7 RNA polymerase, followed by transfection with T7 promoter-containing plasmids bearing the indicated cDNAs²⁸.

Immunoprecipitations and immunoblots. Immunoprecipitations and immunoblots were performed utilizing standard protocols²⁹.

Cytokine production assays. BI-141 T-cells were activated with anti-CD3 MAb 145-2C11, as described elsewhere⁸. Mouse T-cells (either total or CD4-positive) were purified from spleens using magnetic columns (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada). The purity of the cell preparations was verified by flow cytometry, and was consistently greater than 95% (data not shown). T-cells were activated in vitro for 48 hours, using anti-CD3 MAb 145-2C11 coated on plastic. Cytokine production by BI-141 clones or ex vivo T-cells was measured by ELISA⁸. All assays were done in duplicate and were repeated at least three times.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SAP is required for recruitment of FynT to SLAM in normal T-cells.

(a) Thymocytes were isolated from wild-type (SAP⁺) or SAP-deficient (SAP⁻) mice, and were stimulated or not at 37°C with anti-SLAM antibodies. The ability of SLAM to associate with SAP was then examined by immunoblotting of anti-SLAM immunoprecipitates with anti-SAP antibodies (first panel). Tyrosine phosphorylation of SLAM was also monitored, by immunoblotting of anti-SLAM immunoprecipitates with anti-P.tyr antibodies (second panel). Lastly, the association of SLAM with FynT was probed by immunoblotting of anti-SLAM immunoprecipitates with anti-FynT antibodies (third panel). The abundance of SLAM was verified by reprobing of the immunoblot with anti-SLAM antibodies (fourth panel). (b) Expression of SAP and FynT in thymocytes. The expression of SAP and FynT in wild-type and SAP-deficient mice was verified by immunoblotting of total cell lysates with the indicated antibodies.

Figure 2. Binding of SAP to the SH3 domain of FynT. (a) SAP-dependent interaction of the FynT SH3 domain with SLAM. The ability of various fusion proteins to interact with SLAM in lysates of BI-141 T-cells expressing SAP or not, was examined using an in vitro binding assay. SLAM was detected by immunoblotting with anti-SLAM antibodies (anti-SLAM). (b) The FynT SH3 domain interacts with SAP, and not with SLAM. As in (a), except that lysates of BI-141 clones expressing SLAM alone, SAP alone or SLAM and SAP were analyzed. The association with SLAM (first panel) or SAP (second panel) was detected by

immunoblotting with anti-SLAM or anti-SAP, respectively. (c) and (d) Specificity of the interaction between SAP and the FynT SH3 domain. The ability of various SH3 domains to bind SAP was tested as outlined in (a), using either lysates from BI-141 T-cells expressing SAP (c) or lysates from HeLa cells expressing a FLAG-tagged version of SAP (d). The presence of SAP was detected by immunoblotting with anti-SAP (c) or anti-FLAG (d). (e) Direct binding of SAP to the FynT SH3 domain. The ability of bacterially-produced TrpE fusion proteins bearing the SH3 domain of FynT or Lck to interact with bacterially-produced GST-SAP (first panel) or GST (second panel) was examined. TrpE fusions were detected by immunoblotting with anti-TrpE. (f) Effect of mutation of a conserved residue in the FynT SH3 domain. The binding of SAP to various amounts of a GST fusion protein encompassing the wild-type FynT SH3 domain, or a FynT SH3 mutant in which proline 134 was replaced by leucine, was examined. (g) The SH3 domain of FynT is required for SAP-dependent recruitment of FynT to SLAM. Cos-1 cells were transfected with cDNAs encoding a SLAM chimera in which the extracellular and transmembrane segments of SLAM were replaced by those of the α chain of the human IL-2 receptor (Tac), in the presence or absence of SAP and various Myc-tagged forms of FynT. All Myc-tagged FynT proteins lacked the inhibitory carboxyl-terminal domain, in order to ensure that they had equal enzymatic activity. The recruitment of FynT to the Tac-SLAM chimera was detected by immunoblotting of anti-Myc immunoprecipitates with anti-SLAM (top panel).

Figure 3. Mapping the site of interaction between SAP and the FynT SH3 domain. (a) Schematic representation of the chimeras between SAP and its relative EAT-2 that were used in our studies. All chimeras possessed a FLAG tag at the carboxyl-terminus. Their respective ability to bind to the FynT SH3 domain is indicated on the right. (b)-(e) The ability to various chimeras and SAP mutants to interact with the FynT SH3 domain was examined as outlined for Fig. 2a. (f) Alignment of partial sequences of mouse SAP, human SAP, mouse EAT-2 and human EAT-2. The locations of the sixth β sheet and second α helix are indicated. The residues required for binding to the FynT SH3 domain are shown by asterisks. Arginine 78 is boxed, while all other critical residues are highlighted in grey. (g) Schematic representation of the putative FynT SH3 domain-binding site on SAP. The structure of the SAP SH2 domain complexed to the SLAM peptide is based on published data (refs. 16-18).

Figure 4. Arginine 78 of SAP is required to SLAM receptor-mediated signalling in T-cells. BI-141 T-cell clones expressing SLAM alone, SLAM and wild-type SAP (SAP wt) or SLAM and SAP R78A were analyzed. Two separate clones expressing SLAM and SAP R78A, clone (cl.) 4 and clone 6, were studied. (a) Expression of SLAM and SAP. (b) Mutation of arginine 78 of SAP does not interfere with binding of SAP to SLAM, but prevents recruitment of FynT. The binding of SLAM to SAP (top panel) and subsequent recruitment of FynT to SLAM (second panel) was determined by immunoblotting of anti-SLAM immunoprecipitates with anti-SAP and anti-FynT, respectively. The activation of FynT (third panel) was monitored by

immunoblotting of total cell lysates with an antibody detecting phosphorylation at the activating tyrosine of FynT, Y417. (c) Protein tyrosine phosphorylation. Overall protein tyrosine phosphorylation was examined by immunoblotting of total cell lysates with anti-phosphotyrosine (P.tyr). (d) Tyrosine phosphorylation of specific substrates. The indicated substrates were immunoprecipitated with specific antibodies, and their phosphotyrosine content was monitored by immunoblotting with anti-P.tyr.

Figure 5. The SAP-FynT interaction is required for modulation of cytokine production in T-cells. (a) and (b) Cytokine production in activated BI-141 cells. Representative BI-141 cell lines were stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 MAb 145-2C11 coated on plastic, and the production of IL-2 (a) and IFN- γ (b) was measured. The number of the clone used is indicated at the end of the name. While a small reduction of IL-2 production was seen in some of the clones, this effect was not seen in other experiments (data not shown). The basis for this variation is not known. (c) Expression of wild-type SAP and SAP R78A in transgenic mice. T-cells were isolated from spleens of transgenic mice expressing wild-type SAP or SAP R78A. Lysates were then probed by immunoblotting with anti-SAP. (d) and (e). Purified T-cells from transgenic mice were stimulated for 48 hours with anti-CD3 MAb 145-2C11 (3 μ g/ml). Cytokine release was monitored. (d) IL-4 production. (e) IFN- γ production. Similar results were obtained with mice derived from two independent founders of each transgenic type (data not shown).

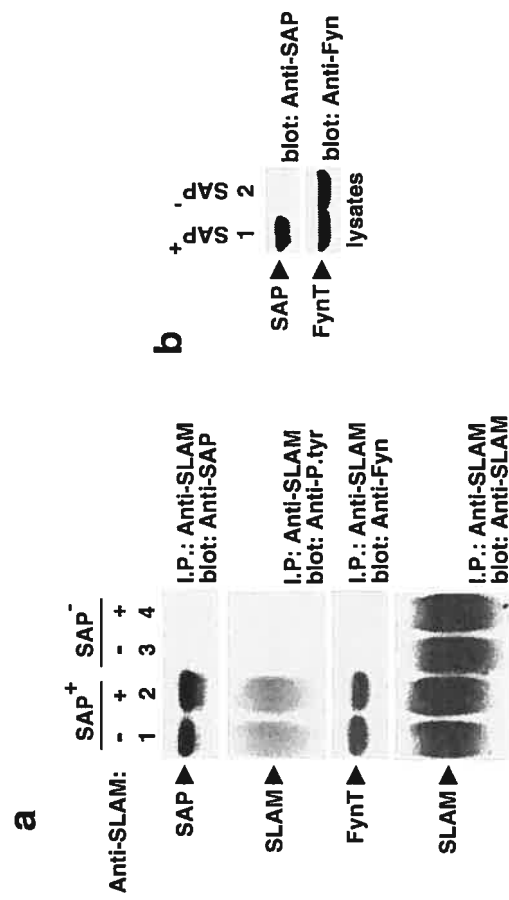


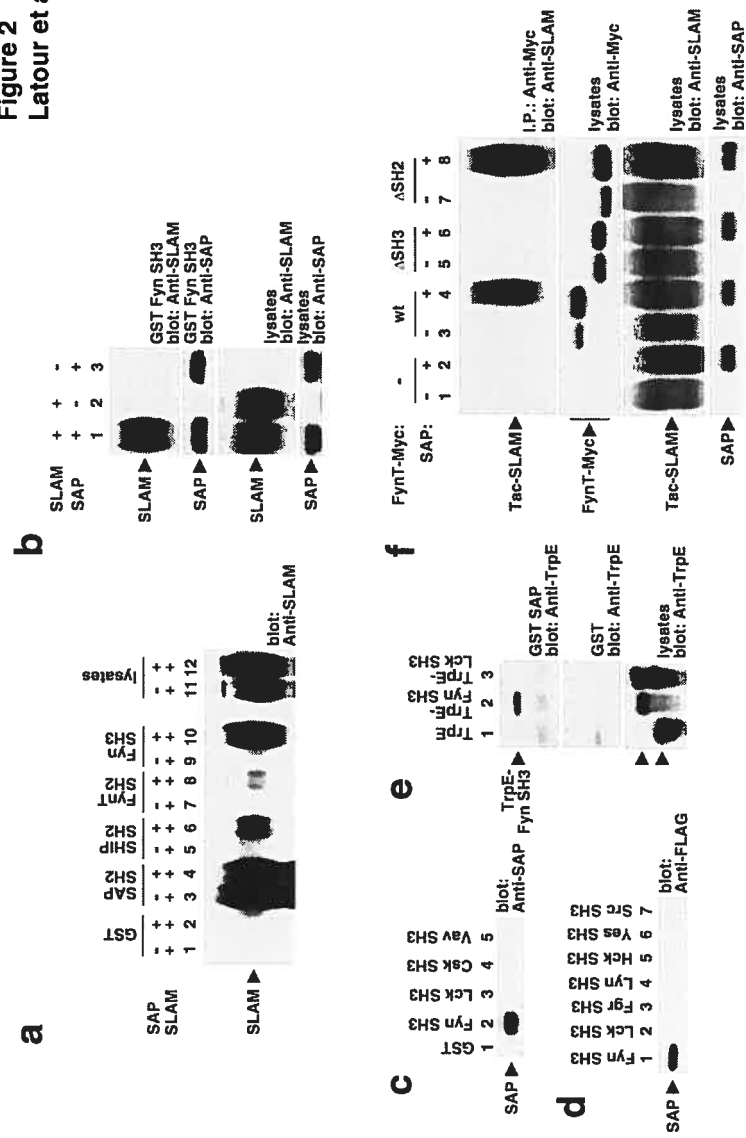
Figure 2
Latour et al.

Figure 3A-E
Latour et al.

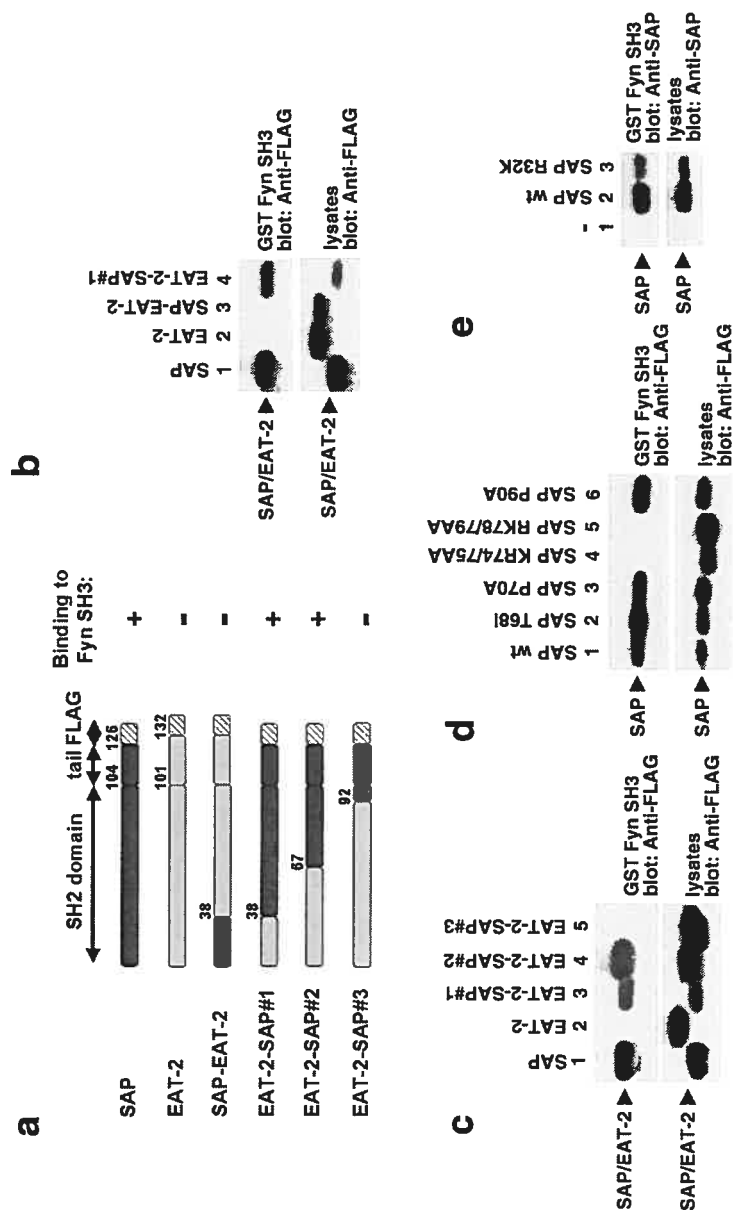


Figure 3F
Latour et al.

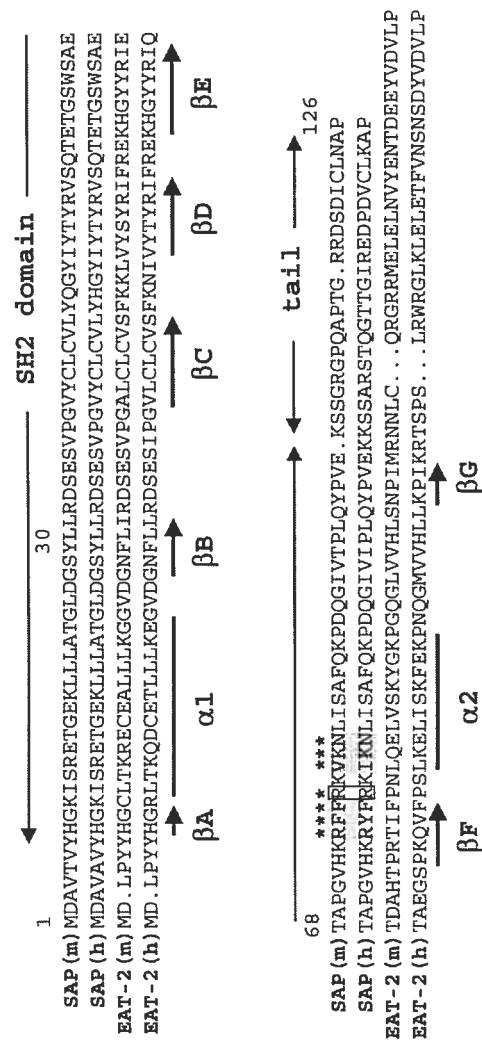


Figure 3g

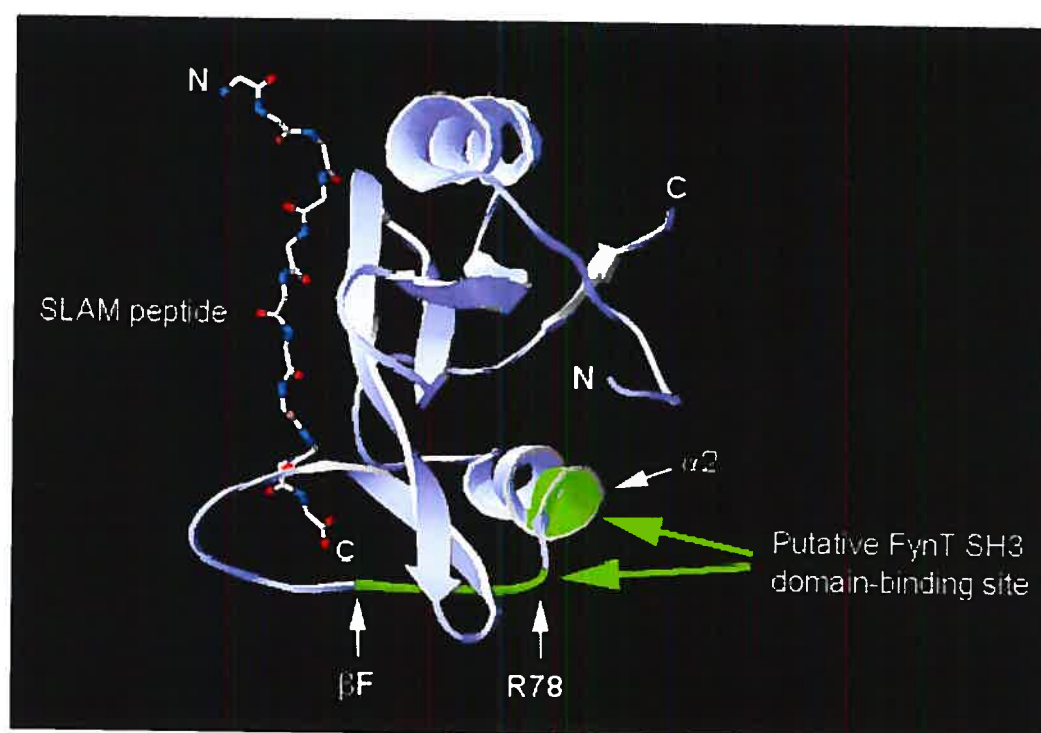


Figure 4
Latour et al.

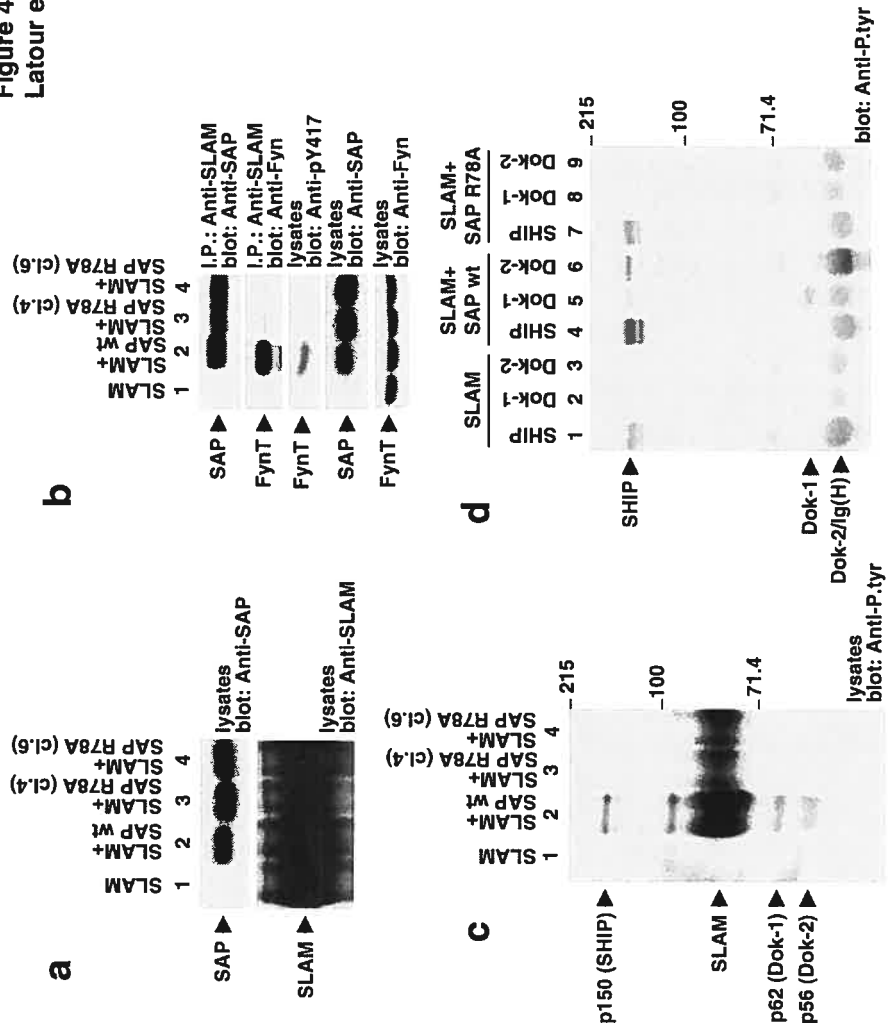
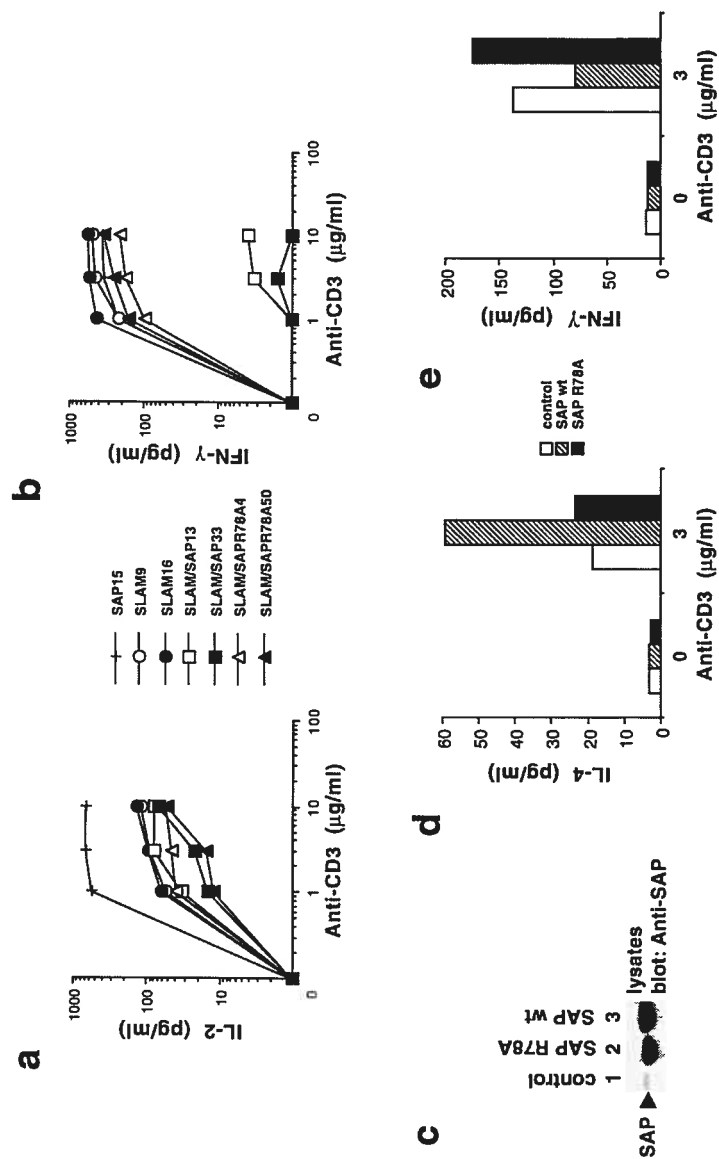


Figure 5
Latour et al.



REFERENCES

1. Malissen, B., G. Ku, M. Hermans, E. Vivier, and M. Malissen. 1995. Genetic dissection of the transducing subunits of the T-cell antigen receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766:173-181.
2. Weiss, A., and D.R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274.
3. Tamir, I., and J.C. Cambier. 1998. Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions. *Oncogene* 17:1353-1364.
4. Chan, A.C., D.M. Desai, and A. Weiss. 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 12:555-592.
5. Sharpe, A.H., and G.J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126.
6. Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21:305-334.
7. Hogg, N., and R.C. Landis. 1993. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 5:383-390.
8. Veillette, A., M.E. Cruz-Munoz, and M.C. Zhong. 2006. SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol* 27:228-234.
9. Veillette, A., and S. Latour. 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15:277-285.
10. Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173.
11. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J.P. Galizzi, C. van Kooten, Y.J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12:881-922.

12. Parker, D.C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11:331-360.
13. Leiden, J.M. 1993. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11:539-570.
14. Zheng, W., and R.A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.
15. Szabo, S.J., B.M. Sullivan, C. Stemann, A.R. Satoskar, B.P. Sleckman, and L.H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338-342.
16. Finotto, S., M.F. Neurath, J.N. Glickman, S. Qin, H.A. Lehr, F.H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P.R. Galle, S.J. Szabo, J.M. Drazen, G.T. De Sanctis, and L.H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
17. Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23:225-274.
18. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5:112-117.
19. Glimcher, L., F.W. Shen, and H. Cantor. 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.* 145:1-9.
20. Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189-220.
21. Unanue, E.R. 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol. Rev.* 158:11-25.
22. Scharton-Kersten, T.M., and A. Sher. 1997. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9:44-51.

23. Biron, C.A., K.S. Byron, and J.L. Sullivan. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320:1731-1735.
24. Herberman, R.B., M.E. Nunn, and D.H. Lavrin. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16:216-229.
25. Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47:187-376.
26. Yokoyama, W.M. 1998. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 10:298-305.
27. Gasser, S., and D.H. Raulet. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214:130-142.
28. Tassi, I., J. Klesney-Tait, and M. Colonna. 2006. Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. *Immunol. Rev.* 214:92-105.
29. Bryceson, Y.T., M.E. March, H.G. Ljunggren, and E.O. Long. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214:73-91.
30. Vely, F., and E. Vivier. 2005. Natural killer cell receptor signaling pathway in mammals. *Sci STKE* 2005:cm7.
31. Lanier, L.L., G. Yu, and J.H. Phillips. 1989. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342:803-805.
32. Unkeless, J.C., E. Scigliano, and V.H. Freedman. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* 6:251-281.
33. Diefenbach, A., A.M. Jamieson, S.D. Liu, N. Shastri, and D.H. Raulet. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1:119-126.

34. Diefenbach, A., E.R. Jensen, A.M. Jamieson, and D.H. Raulet. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-171.
35. Cerwenka, A., A.B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-727.
36. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
37. Diefenbach, A., E. Tomasello, M. Lucas, A.M. Jamieson, J.K. Hsia, E. Vivier, and D.H. Raulet. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3:1142-1149.
38. Gilfillan, S., E.L. Ho, M. Cella, W.M. Yokoyama, and M. Colonna. 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3:1150-1155.
39. Wu, J., Y. Song, A.B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
40. Zompi, S., J.A. Hamerman, K. Ogasawara, E. Schweighoffer, V.L. Tybulewicz, J.P. Di Santo, L.L. Lanier, and F. Colucci. 2003. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 4:565-572.
41. Upshaw, J.L., R.A. Schoon, C.J. Dick, D.D. Billadeau, and P.J. Leibson. 2005. The isoforms of phospholipase C-gamma are differentially used by distinct human NK activating receptors. *J. Immunol.* 175:213-218.
42. Billadeau, D.D., J.L. Upshaw, R.A. Schoon, C.J. Dick, and P.J. Leibson. 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 4:557-564.

43. Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T.I. Arnon, Y. Bushkin, D.M. Davis, J.L. Strominger, J.W. Yewdell, and A. Porgador. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
44. Arnon, T.I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D.G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6:515-523.
45. Karlhofer, F.M., R.K. Ribaud, and W.M. Yokoyama. 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358:66-70.
46. Yokoyama, W.M., and W.E. Seaman. 1993. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* 11:613-635.
47. Correa, I., and D.H. Raulet. 1995. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* 2:61-71.
48. Arase, H., E.S. Mocarski, A.E. Campbell, A.B. Hill, and L.L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323-1326.
49. Kielczewska, A., H.S. Kim, L.L. Lanier, N. Dimasi, and S.M. Vidal. 2007. Critical residues at the Ly49 natural killer receptor's homodimer interface determine functional recognition of m157, a mouse cytomegalovirus MHC class I-like protein. *J. Immunol.* 178:369-377.
50. Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A.M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, and L. Moretta. 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of

- MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178:597-604.
51. Colonna, M., and J. Samaridis. 1995. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268:405-408.
 52. Long, E.O., D.N. Burshtyn, W.P. Clark, M. Peruzzi, S. Rajagopalan, S. Rojo, N. Wagtmann, and C.C. Winter. 1997. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol. Rev.* 155:135-144.
 53. Vance, R.E., J.R. Kraft, J.D. Altman, P.E. Jensen, and D.H. Raulet. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* 188:1841-1848.
 54. Braud, V.M., D.S. Allan, C.A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G.S. Ogg, S. Lazetic, N.T. Young, J.I. Bell, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and A.J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795-799.
 55. Lowin-Kropf, B., B. Kunz, P. Schneider, and W. Held. 2002. A role for the src family kinase Fyn in NK cell activation and the formation of the repertoire of Ly49 receptors. *Eur. J. Immunol.* 32:773-782.
 56. Bloch-Queyrat, C., M.C. Fondaneche, R. Chen, L. Yin, F. Relouzat, A. Veillette, A. Fischer, and S. Latour. 2005. Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J. Exp. Med.* 202:181-192.
 57. Colucci, F., M. Turner, E. Schweighoffer, D. Guy-Grand, V. Di Bartolo, M. Salcedo, V.L. Tybulewicz, and J.P. Di Santo. 1999. Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J. Immunol.* 163:1769-1774.
 58. Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A.C. Chan, and D.Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435-438.

59. Colucci, F., E. Schweighoffer, E. Tomasello, M. Turner, J.R. Ortaldo, E. Vivier, V.L. Tybulewicz, and J.P. Di Santo. 2002. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat Immunol* 3:288-294.
60. Caraux, A., Q. Lu, N. Fernandez, S. Riou, J.P. Di Santo, D.H. Raulet, G. Lemke, and C. Roth. 2006. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat Immunol* 7:747-754.
61. Sjolín, H., E. Tomasello, M. Mousavi-Jazi, A. Bartolazzi, K. Karre, E. Vivier, and C. Cerboni. 2002. Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* 195:825-834.
62. Bakker, A.B., R.M. Hoek, A. Cerwenka, B. Blom, L. Lucian, T. McNeil, R. Murray, L.H. Phillips, J.D. Sedgwick, and L.L. Lanier. 2000. DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* 13:345-353.
63. French, A.R., H. Sjolín, S. Kim, R. Koka, L. Yang, D.A. Young, C. Cerboni, E. Tomasello, A. Ma, E. Vivier, K. Karre, and W.M. Yokoyama. 2006. DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections. *J. Immunol.* 177:4981-4990.
64. Mustelin, T., K.M. Coggeshall, and A. Altman. 1989. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56lck by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:6302-6306.
65. Ostergaard, H.L., D.A. Shackelford, T.R. Hurley, P. Johnson, R. Hyman, B.M. Sefton, and I.S. Trowbridge. 1989. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:8959-8963.
66. Huntington, N.D., Y. Xu, S.L. Nutt, and D.M. Tarlinton. 2005. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J. Exp. Med.* 201:1421-1433.

67. Hesslein, D.G., R. Takaki, M.L. Hermiston, A. Weiss, and L.L. Lanier. 2006. Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7012-7017.
68. Kosugi, A., J. Sakakura, K. Yasuda, M. Ogata, and T. Hamaoka. 2001. Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14:669-680.
69. Stebbins, C.C., C. Watzl, D.D. Billadeau, P.J. Leibson, D.N. Burshtyn, and E.O. Long. 2003. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 23:6291-6299.
70. Nakamura, M.C., E.C. Niemi, M.J. Fisher, L.D. Shultz, W.E. Seaman, and J.C. Ryan. 1997. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.* 185:673-684.
71. Lowin-Kropf, B., B. Kunz, F. Beermann, and W. Held. 2000. Impaired natural killing of MHC class I-deficient targets by NK cells expressing a catalytically inactive form of SHP-1. *J. Immunol.* 165:1314-1321.
72. Wang, J.W., J.M. Howson, T. Ghansah, C. Despons, J.M. Ninos, S.L. May, K.H. Nguyen, N. Toyama-Sorimachi, and W.G. Kerr. 2002. Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science* 295:2094-2097.
73. Colucci, F., E. Rosmaraki, S. Bregenholt, S.I. Samson, V. Di Bartolo, M. Turner, L. Vanes, V. Tybulewicz, and J.P. Di Santo. 2001. Functional dichotomy in natural killer cell signaling: Vav1-dependent and -independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 193:1413-1424.
74. Chan, G., T. Hanke, and K.D. Fischer. 2001. Vav-1 regulates NK T cell development and NK cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 31:2403-2410.

75. Cella, M., K. Fujikawa, I. Tassi, S. Kim, K. Latinis, S. Nishi, W. Yokoyama, M. Colonna, and W. Swat. 2004. Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 200:817-823.
76. Ji, Q.S., G.E. Winnier, K.D. Niswender, D. Horstman, R. Wisdom, M.A. Magnuson, and G. Carpenter. 1997. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:2999-3003.
77. Caraux, A., N. Kim, S.E. Bell, S. Zompi, T. Ranson, S. Lesjean-Pottier, M.E. Garcia-Ojeda, M. Turner, and F. Colucci. 2006. Phospholipase C-gamma2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells. *Blood* 107:994-1002.
78. Di Santo, J.P., R. Kuhn, and W. Muller. 1995. Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol. Rev.* 148:19-34.
79. Noguchi, M., H. Yi, H.M. Rosenblatt, A.H. Filipovich, S. Adelstein, W.S. Modi, O.W. McBride, and W.J. Leonard. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73:147-157.
80. Suzuki, H., G.S. Duncan, H. Takimoto, and T.W. Mak. 1997. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J. Exp. Med.* 185:499-505.
81. Gilmour, K.C., H. Fujii, T. Cranston, E.G. Davies, C. Kinnon, and H.B. Gaspar. 2001. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 98:877-879.
82. Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, and J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in

- natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191:771-780.
83. Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
 84. Colucci, F., and J.P. Di Santo. 2000. The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood* 95:984-991.
 85. McKenna, H.J., K.L. Stocking, R.E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C.R. Maliszewski, D.H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E.R. Roux, M. Teepe, S.D. Lyman, and J.J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.
 86. Lacorazza, H.D., Y. Miyazaki, A. Di Cristofano, A. Deblasio, C. Hedvat, J. Zhang, C. Cordon-Cardo, S. Mao, P.P. Pandolfi, and S.D. Nimer. 2002. The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity* 17:437-449.
 87. Barton, K., N. Muthusamy, C. Fischer, C.N. Ting, T.L. Walunas, L.L. Lanier, and J.M. Leiden. 1998. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 9:555-563.
 88. Colucci, F., S.I. Samson, R.P. DeKoter, O. Lantz, H. Singh, and J.P. Di Santo. 2001. Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* 97:2625-2632.
 89. Ito, A., T.R. Kataoka, D.K. Kim, Y. Koma, Y.M. Lee, and Y. Kitamura. 2001. Inhibitory effect on natural killer activity of microphthalmia transcription factor encoded by the mutant mi allele of mice. *Blood* 97:2075-2083.
 90. Kaisho, T., H. Tsutsui, T. Tanaka, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Kawai, N. Yoshida, K. Nakanishi, and S. Akira. 1999. Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *J. Exp. Med.* 190:1573-1582.

91. Samson, S.I., O. Richard, M. Tavian, T. Ranson, C.A. Vosshenrich, F. Colucci, J. Buer, F. Grosveld, I. Godin, and J.P. Di Santo. 2003. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19:701-711.
92. Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, 3rd, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y.P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R.L. Proia, S.B. Levery, P.B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786-1789.
93. Fischer, K., E. Scotet, M. Niemeyer, H. Koebernick, J. Zerrahn, S. Maillet, R. Hurwitz, M. Kursar, M. Bonneville, S.H. Kaufmann, and U.E. Schaible. 2004. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:10685-10690.
94. Sadowski, I., J.C. Stone, and T. Pawson. 1986. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.* 6:4396-4408.
95. Kay, L.E., D.R. Muhandiram, G. Wolf, S.E. Shoelson, and J.D. Forman-Kay. 1998. Correlation between binding and dynamics at SH2 domain interfaces. *Nat. Struct. Biol.* 5:156-163.
96. Eck, M.J., S.K. Atwell, S.E. Shoelson, and S.C. Harrison. 1994. Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* 368:764-769.
97. Kavanaugh, W.M., and L.T. Williams. 1994. An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266:1862-1865.
98. Horejsi, V., W. Zhang, and B. Schraven. 2004. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:603-616.
99. Zhang, W., C.L. Sommers, D.N. Burshtyn, C.C. Stebbins, J.B. DeJarnette, R.P. Tribble, A. Grinberg, H.C. Tsay, H.M. Jacobs, C.M. Kessler, E.O. Long,

- P.E. Love, and L.E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10:323-332.
100. Aguado, E., S. Richelme, S. Nunez-Cruz, A. Miazek, A.M. Mura, M. Richelme, X.J. Guo, D. Sainty, H.T. He, B. Malissen, and M. Malissen. 2002. Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science* 296:2036-2040.
 101. Nunez-Cruz, S., E. Aguado, S. Richelme, B. Chetaille, A.M. Mura, M. Richelme, L. Pouyet, E. Jouvin-Marche, L. Xerri, B. Malissen, and M. Malissen. 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 4:999-1008.
 102. Sommers, C.L., R.K. Menon, A. Grinberg, W. Zhang, L.E. Samelson, and P.E. Love. 2001. Knock-in mutation of the distal four tyrosines of linker for activation of T cells blocks murine T cell development. *J. Exp. Med.* 194:135-142.
 103. Brdicka, T., M. Imrich, P. Angelisova, N. Brdickova, O. Horvath, J. Spicka, I. Hilgert, P. Luskova, P. Draber, P. Novak, N. Engels, J. Wienands, L. Simeoni, J. Osterreicher, E. Aguado, M. Malissen, B. Schraven, and V. Horejsi. 2002. Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J. Exp. Med.* 196:1617-1626.
 104. Janssen, E., M. Zhu, W. Zhang, S. Koonpaew, and W. Zhang. 2003. LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* 4:117-123.
 105. Wang, Y., O. Horvath, A. Hamm-Baarke, M. Richelme, C. Gregoire, R. Guinamard, V. Horejsi, P. Angelisova, J. Spicka, B. Schraven, B. Malissen, and M. Malissen. 2005. Single and combined deletions of the NTAL/LAB and LAT adaptors minimally affect B-cell development and function. *Mol. Cell. Biol.* 25:4455-4465.
 106. Zhu, M., Y. Liu, S. Koonpaew, O. Granillo, and W. Zhang. 2004. Positive and negative regulation of FcepsilonRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. *J. Exp. Med.* 200:991-1000.

107. Zhu, M., S. Koonpaew, Y. Liu, S. Shen, T. Denning, I. Dzhagalov, I. Rhee, and W. Zhang. 2006. Negative regulation of T cell activation and autoimmunity by the transmembrane adaptor protein LAB. *Immunity* 25:757-768.
108. Brdicka, T., D. Pavlistova, A. Leo, E. Bruyns, V. Korinek, P. Angelisova, J. Scherer, A. Shevchenko, I. Hilgert, J. Cerny, K. Drbal, Y. Kuramitsu, B. Kornacker, V. Horejsi, and B. Schraven. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J. Exp. Med.* 191:1591-1604.
109. Chow, L.M., M. Fournel, D. Davidson, and A. Veillette. 1993. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 365:156-160.
110. Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky, and M. Okada. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 404:999-1003.
111. Davidson, D., M. Bakinowski, M.L. Thomas, V. Horejsi, and A. Veillette. 2003. Phosphorylation-dependent regulation of T-cell activation by PAG/Cbp, a lipid raft-associated transmembrane adaptor. *Mol. Cell. Biol.* 23:2017-2028.
112. Davidson, D., B. Schraven, and A. Veillette. 2007. PAG-associated FynT regulates calcium signaling and promotes anergy in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 27:1960-1973.
113. Dobenecker, M.W., C. Schmedt, M. Okada, and A. Tarakhovsky. 2005. The ubiquitously expressed Csk adaptor protein Cbp is dispensable for embryogenesis and T-cell development and function. *Mol. Cell. Biol.* 25:10533-10542.
114. Xu, S., J. Huo, J.E. Tan, and K.P. Lam. 2005. Cbp deficiency alters Csk localization in lipid rafts but does not affect T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 25:8486-8495.

115. Brdickova, N., T. Brdicka, P. Angelisova, O. Horvath, J. Spicka, I. Hilgert, J. Paces, L. Simeoni, S. Kliche, C. Merten, B. Schraven, and V. Horejsi. 2003. LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. *J. Exp. Med.* 198:1453-1462.
116. Hur, E.M., M. Son, O.H. Lee, Y.B. Choi, C. Park, H. Lee, and Y. Yun. 2003. LIME, a novel transmembrane adaptor protein, associates with p56lck and mediates T cell activation. *J. Exp. Med.* 198:1463-1473.
117. Koretzky, G.A., F. Abtahian, and M.A. Silverman. 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6:67-78.
118. Musci, M.A., L.R. Hendricks-Taylor, D.G. Motto, M. Paskind, J. Kamens, C.W. Turck, and G.A. Koretzky. 1997. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272:11674-11677.
119. Sauer, K., J. Liou, S.B. Singh, D. Yablonski, A. Weiss, and R.M. Perlmutter. 2001. Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276:45207-45216.
120. Lowenstein, E.J., R.J. Daly, A.G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E.Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, and J. Schlessinger. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431-442.
121. Thien, C.B., and W.Y. Langdon. 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:294-307.
122. Joazeiro, C.A., S.S. Wing, H. Huang, J.D. Levenson, T. Hunter, and Y.C. Liu. 1999. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286:309-312.
123. Meng, W., S. Sawadkiosol, S.J. Burakoff, and M.J. Eck. 1999. Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. *Nature* 398:84-90.

124. Deckert, M., C. Elly, A. Altman, and Y.C. Liu. 1998. Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273:8867-8874.
125. Tezuka, T., H. Umemori, N. Fusaki, T. Yagi, M. Takata, T. Kurosaki, and T. Yamamoto. 1996. Physical and functional association of the cbl protooncogen product with an src-family protein tyrosine kinase, p53/56lyn, in the B cell antigen receptor-mediated signaling. *J. Exp. Med.* 183:675-680.
126. Hunter, S., E.A. Burton, S.C. Wu, and S.M. Anderson. 1999. Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274:2097-2106.
127. Miyake, S., M.L. Lupher, Jr., B. Druker, and H. Band. 1998. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:7927-7932.
128. Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W.Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, and Y. Yarden. 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 12:3663-3674.
129. Yoon, C.H., J. Lee, G.D. Jongeward, and P.W. Sternberg. 1995. Similarity of sli-1, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene c-cbl. *Science* 269:1102-1105.
130. Jongeward, G.D., T.R. Clandinin, and P.W. Sternberg. 1995. sli-1, a negative regulator of let-23-mediated signaling in *C. elegans*. *Genetics* 139:1553-1566.
131. Bachmaier, K., C. Krawczyk, I. Kozieradzki, Y.Y. Kong, T. Sasaki, A. Oliveira-dos-Santos, S. Mariathasan, D. Bouchard, A. Wakeham, A. Itie, J. Le, P.S. Ohashi, I. Sarosi, H. Nishina, S. Lipkowitz, and J.M. Penninger. 2000. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403:211-216.

132. Chiang, Y.J., H.K. Kile, K. Brown, M. Naramura, S. Fukuhara, R.J. Hu, I.K. Jang, J.S. Gutkind, E. Shevach, and H. Gu. 2000. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 403:216-220.
133. Murphy, M.A., R.G. Schnall, D.J. Venter, L. Barnett, I. Bertoncello, C.B. Thien, W.Y. Langdon, and D.D. Bowtell. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 18:4872-4882.
134. Naramura, M., I.K. Jang, H. Kile, F. Huang, D. Haines, and H. Gu. 2002. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3:1192-1199.
135. Kitaura, Y., I.K. Jang, Y. Wang, Y.C. Han, T. Inazu, E.J. Cadera, M. Schlissel, R.R. Hardy, and H. Gu. 2007. Control of the B Cell-Intrinsic Tolerance Programs by Ubiquitin Ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity* 26:567-578.
136. Purtilo, D.T., C.K. Cassel, J.P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1:935-940.
137. Hamilton, J.K., L.A. Paquin, J.L. Sullivan, H.S. Maurer, F.G. Cruze, A.J. Provisor, C.P. Steuber, E. Hawkins, D. Yawn, J.A. Cornet, K. Clausen, G.Z. Finkelstein, B. Landing, M. Grunnet, and D.T. Purtilo. 1980. X-linked lymphoproliferative syndrome registry report. *J. Pediatr.* 96:669-673.
138. Bar, R.S., C.J. DeLor, K.P. Clausen, P. Hurtubise, W. Henle, and J.F. Hewetson. 1974. Fatal infectious mononucleosis in a family. *N. Engl. J. Med.* 290:363-367.
139. Sullivan, J.L., K.S. Byron, F.E. Brewster, S.M. Baker, and H.D. Ochs. 1983. X-linked lymphoproliferative syndrome. Natural history of the immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* 71:1765-1778.
140. Nichols, K.E., D.P. Harkin, S. Levitz, M. Krainer, K.A. Kolquist, C. Genovese, A. Bernard, M. Ferguson, L. Zuo, E. Snyder, A.J. Buckler, C. Wise, J. Ashley, M. Lovett, M.B. Valentine, A.T. Look, W. Gerald, D.E.

- Housman, and D.A. Haber. 1998. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:13765-13770.
141. Coffey, A.J., R.A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G.R. Howell, J.M. Bye, A.P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C.J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, A. Bolino, M. Seri, A. Lanyi, J.R. Davis, D. Webster, A. Harris, G. Lenoir, G. de St Basile, A. Jones, B.H. Behloradsky, H. Achatz, J. Murken, R. Fassler, J. Sumegi, G. Romeo, M. Vaudin, M.T. Ross, A. Meindl, and D.R. Bentley. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.* 20:129-135.
 142. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M.G. Roncarolo, H. Oettgen, J.E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
 143. Cocks, B.G., C.C. Chang, J.M. Carballido, H. Yssel, J.E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263.
 144. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
 145. Shlapatska, L.M., S.V. Mikhlap, A.G. Berdova, O.M. Zelensky, T.J. Yun, K.E. Nichols, E.A. Clark, and S.P. Sidorenko. 2001. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J. Immunol.* 166:5480-5487.
 146. Howie, D., M. Simarro, J. Sayos, M. Guirado, J. Sancho, and C. Terhorst. 2002. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of

CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 99:957-965.

147. Poy, F., M.B. Yaffe, J. Sayos, K. Saxena, M. Morra, J. Sumegi, L.C. Cantley, C. Terhorst, and M.J. Eck. 1999. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol. Cell* 4:555-561.
148. Chen, R., S. Latour, X. Shi, and A. Veillette. 2006. Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol. Cell. Biol.* 26:5559-5568.
149. Latour, S., G. Gish, C.D. Helgason, R.K. Humphries, T. Pawson, and A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* 2:681-690.
150. Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P.L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 5:149-154.
151. Liu, Q., D. Berry, P. Nash, T. Pawson, C.J. McGlade, and S.S. Li. 2003. Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. *Mol. Cell* 11:471-481.
152. Young, M.A., S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux, and J. Kuriyan. 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105:115-126.
153. Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J.A. Cooper, and H. Nakagawa. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351:69-72.

154. Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C.H. Lee, J. Kuriyan, and W.T. Miller. 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385:650-653.
155. Porter, M., T. Schindler, J. Kuriyan, and W.T. Miller. 2000. Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr(527) and Tyr(416). Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. *J. Biol. Chem.* 275:2721-2726.
156. Yamaguchi, H., and W.A. Hendrickson. 1996. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384:484-489.
157. Davidson, D., X. Shi, S. Zhang, H. Wang, M. Nemer, N. Ono, S. Ohno, Y. Yanagi, and A. Veillette. 2004. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21:707-717.
158. Cannons, J.L., L.J. Yu, B. Hill, L.A. Mijares, D. Dombroski, K.E. Nichols, A. Antonellis, G.A. Koretzky, K. Gardner, and P.L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21:693-706.
159. Sun, Z., C.W. Arendt, W. Ellmeier, E.M. Schaeffer, M.J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P.L. Schwartzberg, and D.R. Littman. 2000. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404:402-407.
160. Liu, Y., S. Witte, Y.C. Liu, M. Doyle, C. Elly, and A. Altman. 2000. Regulation of protein kinase Ctheta function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275:3603-3609.
161. Wu, C., K.B. Nguyen, G.C. Pien, N. Wang, C. Gullo, D. Howie, M.R. Sosa, M.J. Edwards, P. Borrow, A.R. Satoskar, A.H. Sharpe, C.A. Biron, and C. Terhorst. 2001. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol* 2:410-414.

162. Czar, M.J., E.N. Kersh, L.A. Mijares, G. Lanier, J. Lewis, G. Yap, A. Chen, A. Sher, C.S. Duckett, R. Ahmed, and P.L. Schwartzberg. 2001. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:7449-7454.
163. Morra, M., R.A. Barrington, A.C. Abadia-Molina, S. Okamoto, A. Julien, C. Gullo, A. Kalsy, M.J. Edwards, G. Chen, R. Spolski, W.J. Leonard, B.T. Huber, P. Borrow, C.A. Biron, A.R. Satoskar, M.C. Carroll, and C. Terhorst. 2005. Defective B cell responses in the absence of SH2D1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:4819-4823.
164. Crotty, S., E.N. Kersh, J. Cannons, P.L. Schwartzberg, and R. Ahmed. 2003. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421:282-287.
165. Hron, J.D., L. Caplan, A.J. Gerth, P.L. Schwartzberg, and S.L. Peng. 2004. SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200:261-266.
166. Cannons, J.L., L.J. Yu, D. Jankovic, S. Crotty, R. Horai, M. Kirby, S. Anderson, A.W. Cheever, A. Sher, and P.L. Schwartzberg. 2006. SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J. Exp. Med.* 203:1551-1565.
167. Nonoyama, S., D. Hollenbaugh, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, and H.D. Ochs. 1993. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J. Exp. Med.* 178:1097-1102.
168. Randall, T.D., A.W. Heath, L. Santos-Argumedo, M.C. Howard, I.L. Weissman, and F.E. Lund. 1998. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8:733-742.
169. Dong, C., A.E. Juedes, U.A. Temann, S. Shresta, J.P. Allison, N.H. Ruddle, and R.A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97-101.

170. McAdam, A.J., R.J. Greenwald, M.A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409:102-105.
171. Aruffo, A., M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L.S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, and et al. 1993. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72:291-300.
172. Ma, C.S., N.J. Hare, K.E. Nichols, L. Dupre, G. Andolfi, M.G. Roncarolo, S. Adelstein, P.D. Hodgkin, and S.G. Tangye. 2005. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells. *J. Clin. Invest.* 115:1049-1059.
173. Chen, G., A.K. Tai, M. Lin, F. Chang, C. Terhorst, and B.T. Huber. 2005. Signaling lymphocyte activation molecule-associated protein is a negative regulator of the CD8 T cell response in mice. *J. Immunol.* 175:2212-2218.
174. Yin, L., U. Al-Alem, J. Liang, W.M. Tong, C. Li, M. Badiali, J.J. Medard, J. Sumegi, Z.Q. Wang, and G. Romeo. 2003. Mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene *sap* exhibit increased susceptibility to murine gammaherpesvirus-68 and hypo-gammaglobulinemia. *J. Med. Virol.* 71:446-455.
175. Castro, A.G., T.M. Hauser, B.G. Cocks, J. Abrams, S. Zurawski, T. Churakova, F. Zonin, D. Robinson, S.G. Tangye, G. Aversa, K.E. Nichols, J.E. de Vries, L.L. Lanier, and A. O'Garra. 1999. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 163:5860-5870.
176. Harada, S., K. Sakamoto, J.K. Seeley, T. Lindsten, T. Bechtold, J. Yetz, G. Rogers, G. Pearson, and D.T. Purtilo. 1982. Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. I. Epstein-Barr virus-specific defects. *J. Immunol.* 129:2532-2535.

177. Sharifi, R., J.C. Sinclair, K.C. Gilmour, P.D. Arkwright, C. Kinnon, A.J. Thrasher, and H.B. Gaspar. 2004. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 103:3821-3827.
178. Dupre, L., G. Andolfi, S.G. Tangye, R. Clementi, F. Locatelli, M. Arico, A. Aiuti, and M.G. Roncarolo. 2005. SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105:4383-4389.
179. Valiante, N.M., and G. Trinchieri. 1993. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178:1397-1406.
180. Schuhmachers, G., K. Ariizumi, P.A. Mathew, M. Bennett, V. Kumar, and A. Takashima. 1995. 2B4, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is expressed on murine dendritic epidermal T cells and plays a functional role in their killing of skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 105:592-596.
181. Mathew, P.A., B.A. Garni-Wagner, K. Land, A. Takashima, E. Stoneman, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 151:5328-5337.
182. Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein, and M. Colonna. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 29:1676-1683.
183. Schatzle, J.D., S. Sheu, S.E. Stepp, P.A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1999. Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:3870-3875.
184. Kambayashi, T., E. Assarsson, B.J. Chambers, and H.G. Ljunggren. 2001. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J. Immunol.* 167:6706-6710.
185. Lee, K.M., S. Bhawan, T. Majima, H. Wei, M.I. Nishimura, H. Yagita, and V. Kumar. 2003. Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-

- specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells. *J. Immunol.* 170:4881-4885.
186. Morra, M., M. Simarro-Grande, M. Martin, A.S. Chen, A. Lanyi, O. Silander, S. Calpe, J. Davis, T. Pawson, M.J. Eck, J. Sumegi, P. Engel, S.C. Li, and C. Terhorst. 2001. Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J. Biol. Chem.* 276:36809-36816.
 187. Tangye, S.G., S. Lazetic, E. Woollatt, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 162:6981-6985.
 188. Vaidya, S.V., S.E. Stepp, M.E. McNerney, J.K. Lee, M. Bennett, K.M. Lee, C.L. Stewart, V. Kumar, and P.A. Mathew. 2005. Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells. *J. Immunol.* 174:800-807.
 189. Peck, S.R., and H.E. Ruley. 2000. Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* 52:63-72.
 190. Valdez, P.A., H. Wang, D. Seshasayee, M. van Lookeren Campagne, A. Gurney, W.P. Lee, and I.S. Grewal. 2004. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* 279:18662-18669.
 191. Howie, D., F.S. Laroux, M. Morra, A.R. Satoskar, L.E. Rosas, W.A. Faubion, A. Julien, S. Rietdijk, A.J. Coyle, C. Fraser, and C. Terhorst. 2005. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J. Immunol.* 174:5931-5935.
 192. Morra, M., J. Lu, F. Poy, M. Martin, J. Sayos, S. Calpe, C. Gullo, D. Howie, S. Rietdijk, A. Thompson, A.J. Coyle, C. Denny, M.B. Yaffe, P. Engel, M.J. Eck, and C. Terhorst. 2001. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20:5840-5852.

193. Graham, D.B., M.P. Bell, M.M. McCausland, C.J. Huntoon, J. van Deursen, W.A. Faubion, S. Crotty, and D.J. McKean. 2006. Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J. Immunol.* 176:291-300.
194. Martin, M., J.M. Del Valle, I. Saborit, and P. Engel. 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J. Immunol.* 174:5977-5986.
195. Del Valle, J.M., P. Engel, and M. Martin. 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J. Biol. Chem.* 278:17430-17437.
196. Martin, M., X. Romero, M.A. de la Fuente, V. Tovar, N. Zapater, E. Esplugues, P. Pizcueta, J. Bosch, and P. Engel. 2001. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J. Immunol.* 167:3668-3676.
197. Tangye, S.G., K.E. Nichols, N.J. Hare, and B.C. van de Weerd. 2003. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J. Immunol.* 171:2485-2495.
198. Lee, K.M., M.E. McNerney, S.E. Stepp, P.A. Mathew, J.D. Schatzle, M. Bennett, and V. Kumar. 2004. 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J. Exp. Med.* 199:1245-1254.
199. Sivori, S., M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2002. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:4526-4531.
200. Garni-Wagner, B.A., A. Purohit, P.A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted

- cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 151:60-70.
201. Tangye, S.G., H. Cherwinski, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 2000. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol. Immunol.* 37:493-501.
 202. Sayos, J., K.B. Nguyen, C. Wu, S.E. Stepp, D. Howie, J.D. Schatzle, V. Kumar, C.A. Biron, and C. Terhorst. 2000. Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int. Immunol.* 12:1749-1757.
 203. Chen, R., F. Relouzat, R. Roncagalli, A. Aoukaty, R. Tan, S. Latour, and A. Veillette. 2004. Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol. Cell. Biol.* 24:5144-5156.
 204. Tangye, S.G., J.H. Phillips, L.L. Lanier, and K.E. Nichols. 2000. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 165:2932-2936.
 205. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H.D. Ochs, H. Wolf, J.Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L.D. Notarangelo, and A. Moretta. 2000. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337-346.
 206. Eissmann, P., L. Beauchamp, J. Wooters, J.C. Tilton, E.O. Long, and C. Watzl. 2005. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* 105:4722-4729.
 207. Bryceson, Y.T., M.E. March, H.G. Ljunggren, and E.O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.
 208. Mooney, J.M., J. Klem, C. Wulfig, L.A. Mijares, P.L. Schwartzberg, M. Bennett, and J.D. Schatzle. 2004. The murine NK receptor 2B4 (CD244)

- exhibits inhibitory function independent of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein expression. *J. Immunol.* 173:3953-3961.
209. McNerney, M.E., D. Guzik, and V. Kumar. 2005. 2B4 (CD244)-CD48 interactions provide a novel MHC class I-independent system for NK-cell self-tolerance in mice. *Blood* 106:1337-1340.
 210. Sylla, B.S., K. Murphy, E. Cahir-McFarland, W.S. Lane, G. Mosialos, and E. Kieff. 2000. The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SH2D1A associates with p62dok (Dok1) and activates NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:7470-7475.
 211. Bottino, C., R. Augugliaro, R. Castriconi, M. Nanni, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 30:3718-3722.
 212. Aoukaty, A., and R. Tan. 2002. Association of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP/SH2D1A with 2B4, a natural killer cell-activating molecule, is dependent on phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 277:13331-13337.
 213. Klem, J., P.C. Verrett, V. Kumar, and J.D. Schatzle. 2002. 2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function. *J. Immunol.* 169:55-62.
 214. Chiesa, S., M. Mingueneau, N. Fuseri, B. Malissen, D.H. Raulet, M. Malissen, E. Vivier, and E. Tomasello. 2006. Multiplicity and plasticity of natural killer cell signaling pathways. *Blood* 107:2364-2372.
 215. Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L.D. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr

- virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Exp. Med.* 194:235-246.
216. Stark, S., and C. Watzl. 2006. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int. Immunol.* 18:241-247.
 217. Bouchon, A., M. Cella, H.L. Grierson, J.I. Cohen, and M. Colonna. 2001. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J. Immunol.* 167:5517-5521.
 218. Lee, J.K., K.S. Boles, and P.A. Mathew. 2004. Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs. *Eur. J. Immunol.* 34:2791-2799.
 219. Pasquier, B., L. Yin, M.C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. de Saint-Basile, and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J. Exp. Med.* 201:695-701.
 220. Nichols, K.E., J. Hom, S.Y. Gong, A. Ganguly, C.S. Ma, J.L. Cannons, S.G. Tangye, P.L. Schwartzberg, G.A. Koretzky, and P.L. Stein. 2005. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat. Med.* 11:340-345.
 221. Gadue, P., N. Morton, and P.L. Stein. 1999. The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *J. Exp. Med.* 190:1189-1196.
 222. Thompson, A.D., B.S. Braun, A. Arvand, S.D. Stewart, W.A. May, E. Chen, J. Korenberg, and C. Denny. 1996. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 13:2649-2658.
 223. Wandstrat, A.E., C. Nguyen, N. Limaye, A.Y. Chan, S. Subramanian, X.H. Tian, Y.S. Yim, A. Pertsemlidis, H.R. Garner, Jr., L. Morel, and E.K. Wakeland. 2004. Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* 21:769-780.

224. Kumar, K.R., L. Li, M. Yan, M. Bhaskarabhatla, A.B. Mobley, C. Nguyen, J.M. Mooney, J.D. Schatzle, E.K. Wakeland, and C. Mohan. 2006. Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108. *Science* 312:1665-1669.
225. Thien, C.B., D.D. Bowtell, and W.Y. Langdon. 1999. Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in c-Cbl-deficient thymocytes. *J. Immunol.* 162:7133-7139.
226. Rao, N., S. Miyake, A.L. Reddi, P. Douillard, A.K. Ghosh, I.L. Dodge, P. Zhou, N.D. Fernandes, and H. Band. 2002. Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3794-3799.
227. Songyang, Z., S.E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X.R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, and et al. 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 14:2777-2785.
228. Buday, L., A. Khwaja, S. Sipeki, A. Farago, and J. Downward. 1996. Interactions of Cbl with two adapter proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271:6159-6163.
229. Chan, B., A. Lanyi, H.K. Song, J. Griesbach, M. Simarro-Grande, F. Poy, D. Howie, J. Sumegi, C. Terhorst, and M.J. Eck. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 5:155-160.
230. Briggs, S.D., M. Sharkey, M. Stevenson, and T.E. Smithgall. 1997. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 272:17899-17902.
231. Tribble, R.P., L. Emert-Sedlak, and T.E. Smithgall. 2006. HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J. Biol. Chem.* 281:27029-27038.
232. Anafi, M., M.K. Rosen, G.D. Gish, L.E. Kay, and T. Pawson. 1996. A potential SH3 domain-binding site in the Crk SH2 domain. *J. Biol. Chem.* 271:21365-21374.

233. Nakajima, H., M. Cella, A. Bouchon, H.L. Grierson, J. Lewis, C.S. Duckett, J.I. Cohen, and M. Colonna. 2000. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 30:3309-3318.
234. Tangye, S.G., B.C. van de Weerdt, D.T. Avery, and P.D. Hodgkin. 2002. CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur. J. Immunol.* 32:1640-1649.
235. Tassi, I., and M. Colonna. 2005. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J. Immunol.* 175:7996-8002.
236. Doucey, M.A., L. Scarpellino, J. Zimmer, P. Guillaume, I.F. Luescher, C. Bron, and W. Held. 2004. Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition. *Nat Immunol* 5:328-336.
237. Scarpellino, L., F. Oeschger, P. Guillaume, J.D. Coudert, F. Levy, G. Leclercq, and W. Held. 2007. Interactions of Ly49 Family Receptors with MHC Class I Ligands in trans and cis. *J. Immunol.* 178:1277-1284.